

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Técnicas de criação de juvenis de *M. margaritifera* para
repovoamentos: sobrevivência e crescimento nas primeiras
semanas de vida**

Joana Vidal de Almeida Pereira

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação orientada por:

Joaquim Reis (MARE-FCUL)

Filomena Magalhães (FCUL)

2021

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto “medidas de CONSERVAÇÃO E GESTÃO ORIENTADAS PARA O MEXILHÃO-DO-RIO (*Margaritifera margaritifera*)”, cofinanciado pela União Europeia e pelo Fundo Ambiental (POSEUR 15-2018-03), tendo como entidade promotora a QUERCUS – Associação Nacional de Conservação da Natureza. O Instituto Politécnico de Bragança (IPB) é responsável pela coordenação técnico-científica do projeto, sendo a BIOTA – Estudos e Divulgação em Ambiente, Lda., a entidade responsável pela implementação da Ação 6 – Reprodução *ex-situ* de *Margaritifera margaritifera*. A ação foi implementada no Posto Aquícola de Castrelos, instalações do Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF, IP).

A captura de animais utilizados neste trabalho foi feita ao abrigo das licenças nº 322/2020/CAPT e 336/2020/CAPT emitidas pelo ICNF, IP.

AGRADECIMENTOS

A concretização desta tese de mestrado não teria sido possível sem o apoio de inúmeras pessoas, às quais gostaria de agradecer.

Aos meus orientadores, Joaquim Reis e Filomena Magalhães, por terem aceitado conduzir o meu trabalho e por todas as contribuições valiosas ao longo do processo.

À Patricia Rodrigues, da BIOTA, e também ao Daniel Pires, que dedicou várias horas do seu escasso tempo disponível para esclarecer as minhas dúvidas.

À Maria García Alvarez, que foi uma companheira imprescindível durante todo o trabalho.

Ao Amílcar Teixeira, Fernando Miranda e Fernando Teixeira, IPB, pelo apoio técnico prestado durante a realização do trabalho de campo, mas acima de tudo pela hospitalidade e simpatia.

Aos senhores José Veiga e Manuel Borges, ICNF, IP, que me auxiliaram de forma incansável no trabalho realizado no Posto Aquícola de Castrelos.

À equipa do Posto Aquícola do Boticas Parque Natureza e Biodiversidade, pelo apoio técnico.

Ao Daniel Garrido López, pela obtenção e cedência de dados relevantes para o trabalho.

À Paz Ondina, da Universidade de Santiago de Compostela, pela cedência de dados do projeto LIFE Margal Ulla (LIFE 09NAT/ES/000514).

Aos meus amigos que, de forma direta ou indireta, fizeram parte do meu percurso académico e continuarão, certamente, a acompanhar-me. Um obrigada especial à Beatriz Afonso e à Joana Farrusco pela motivação e ajuda extras.

Ao Marco, que me apoiou incondicionalmente e incentivou a fazer o meu melhor.

Aos meus pais, por tudo o que investiram em mim e na minha educação.

SUMÁRIO

O mexilhão-de-rio-do-norte *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Unionida) é um dos bivalves de água doce mais ameaçado em todo o mundo, principalmente devido à ausência de recrutamento nas populações naturais. O ciclo de vida desta espécie é marcado pela produção de larvas – gloquídeos – que têm obrigatoriamente de parasitar um salmonídeo. Concluído o processo de metamorfose, os juvenis libertam-se do hospedeiro e estabelecem-se na zona hiporeica dos cursos de água. Esta fase pós-parasítica é crítica para a subsistência da espécie, uma vez que os juvenis são particularmente sensíveis a perturbações no meio intersticial.

Em Portugal, *M. margaritifera* ocorre apenas em sete rios da região norte, encontrando-se as populações em risco elevado de extinção. Atualmente, está em curso um plano de recuperação desta espécie que, para além da reabilitação das populações do seu hospedeiro, a truta-de-rio *Salmo trutta*, e restauro de habitat ecologicamente funcional, inclui um programa de criação de juvenis em cativeiro, para introdução em meio natural e recuperação das populações envelhecidas.

Este trabalho teve como principal objetivo contribuir para a otimização das condições de criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro, através da comparação das taxas de sobrevivência e crescimento de indivíduos criados sob diferentes técnicas, nomeadamente em sistema artificial e semi-natural.

Os juvenis de *M. margaritifera* foram obtidos através da infeção de trutas-de-rio em condições controladas. Parte dos juvenis foram mantidos em recipientes plásticos sem circulação de água, com alimentação artificial (sistema fechado), e parte em substrato natural em *raceway* interior, alimentada com água do rio e sem intervenção humana (sistema aberto). Depois de 3 meses em cativeiro, os juvenis foram reintroduzidos em três locais do rio Beça, em sistemas de retenção (tubos de rede) enterrados verticalmente na zona hiporeica. Alguns juvenis foram mantidos em *raceway* interior, dentro e fora de tubos, de forma a comparar o crescimento de juvenis confinados e a crescer em liberdade e, desta forma, despistar o efeito do sistema de retenção no crescimento dos juvenis. As taxas de sobrevivência e crescimento foram monitorizadas durante o período de cativeiro, ao longo de 3 meses, e no rio, ao longo de 6 semanas, e comparadas entre os vários sistemas. Por último, a sobrevivência e crescimento obtidos em sistema fechado foram comparados com os parâmetros alcançados em programas semelhantes utilizando diferentes dietas.

A taxa de sobrevivência dos juvenis criados em sistema fechado decresceu gradualmente ao longo do período experimental, sendo que apenas 15% dos indivíduos sobreviveram ao fim de 3 meses. Estes juvenis atingiram, em média, um comprimento máximo de concha de 452,92 ($\pm 48,45$) μm . Comparando com a mistura de algas utilizada neste trabalho, concluiu-se que uma dieta à base de algas suplementada com detritos é mais benéfica ao desenvolvimento dos juvenis, provavelmente devido ao seu elevado conteúdo nutricional e ação nitrificante. Não foi possível avaliar a sobrevivência no sistema aberto. Neste sistema, os juvenis atingiram um comprimento médio de 561,49 ($\pm 69,99$) μm , que corresponde a um incremento em tamanho três vezes superior ao dos juvenis de sistema fechado. A taxa de crescimento dos juvenis criados em *raceway* foi significativamente maior que a dos juvenis mantidos nos recipientes plásticos.

Todos os juvenis introduzidos nos setores a montante e jusante do rio Beça morreram ao fim de duas semanas, quando se observaram condições deficientes de oxigenação do meio intersticial. A taxa de sobrevivência no setor médio para juvenis provenientes de sistema aberto e fechado foi de 30% e 7%, respetivamente. No final da experiência *in-situ*, não foi detetado crescimento em nenhum dos grupos. Após cerca de dois meses, os juvenis confinados em tubos dentro da *raceway* exibiram um comprimento de concha significativamente menor do que os juvenis a crescer livremente em substrato natural no mesmo tanque, o que sugere um possível efeito prejudicial do sistema de retenção usado no crescimento dos juvenis.

Concluiu-se que, em termos de sistema de criação, o sistema aberto apresenta a melhor relação esforço-resultados, produzindo um elevado número de juvenis saudáveis com pouca necessidade de intervenção. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e outros semelhantes, considera-se que a introdução em meio natural de juvenis provenientes de programas de reprodução em cativeiro só deverá ocorrer depois destes atingirem, no mínimo, um comprimento de concha de 1 mm. Este “método misto” permite criar os mexilhões em condições controladas durante a fase mais crítica do seu desenvolvimento e, conseqüentemente, maximizar a sua taxa de sobrevivência em meio natural. Apesar de ainda ser necessário clarificar o impacto dos sistemas de retenção no desenvolvimento dos mexilhões, a sua utilização *in-situ* pode ser vantajosa, no sentido em que permite monitorizar a sobrevivência e crescimento dos juvenis e avaliar o sucesso das medidas de conservação aplicadas.

Palavras-chave: Mexilhão-de-rio; Conservação; Reprodução em cativeiro; Recrutamento; Monitorização.

ABSTRACT

The freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Unionida) is one of the most threatened freshwater bivalves worldwide mainly due to the lack of recruitment in natural populations. The life cycle of this species is marked by the production of larvae – glochidia – that are obligated parasites of salmonids. After the metamorphosis process is completed, juveniles excise from the host and settle in the hyporheic zone. Since juveniles are particularly sensitive to disturbances in the interstitial environment, this post-parasitic phase is critical for the persistence of the species.

In Portugal, *M. margaritifera* is only present in seven rivers of the northern region, with populations at high risk of extinction. Currently, a recovery plan for this species is underway which includes the rehabilitation of its host populations, the river brown trout *Salmo trutta*, the restoration of ecologically functional habitats, and a captive rearing program for juveniles to be reintroduced for recovery of aging populations.

The main objective of this work is to contribute to the optimization of the captive breeding conditions of *M. margaritifera* juveniles by comparing the survival and growth rates of individuals raised under different techniques, namely in artificial and semi-natural systems.

Juvenile freshwater pearl mussels were obtained through infection of river brown trouts under controlled conditions and subsequently raised in two different systems: part of the juveniles was kept in plastic containers without water circulation (closed system), while artificially fed, and the rest released into natural substrate of an indoor raceway supplied with river water (open flow-through system) and grew without human intervention. About 3 months after excystment from the host, the captive-bred juveniles were released into the Beça river, at three different locations, inside field cages (mesh tubes) installed in a vertical position in the hyporheic zone. Some juveniles were kept in an indoor raceway, inside and outside tubes, to compare the growth of confined and unconfined juveniles and evaluate the effect of the retention system on juvenile growth. Survival and growth rates were monitored during the captivity period, over 3 months, and in the river, over 6 weeks, and compared between different systems. Finally, the survival and growth obtained for juveniles kept in the closed system were compared with the parameters achieved in similar programs using different diets.

Post-parasitic mussels raised in plastic containers showed a gradual decline in survival rate throughout the experimental period, with only 15% of individuals surviving after 3 months, and reaching a maximum shell length of 452,92 ($\pm 48,45$) μm . In comparison with the algae mixture used in this work, an algae-based diet supplemented with detritus was more beneficial to the development of juveniles, probably due to its high nutritional content and nitrifying action. It was not possible to assess survival in the flow-through system. In this system, juveniles reached an average length of 561,49 ($\pm 69,99$) μm , corresponding to an increase in length three times that observed in the closed system. The individuals raised in the flow-through system had a significantly higher growth rate than juveniles in the closed system.

All juveniles introduced in the upstream and downstream sectors of the Beça river died after 2 weeks, when deficient oxygen conditions in the substratum interstitials were observed. The survival rate in the medium sector of the river for juveniles raised in open and closed systems was 30% and 7%, respectively. By the end of the *in-situ* experiment, no growth was detected in any of the groups. After about two months, juveniles confined to mesh tubes within the raceway exhibited significantly smaller shell length than juveniles released into natural substrate in the same tank, which suggests a possible detrimental effect of the field cage used on juvenile growth.

In conclusion, the open system presents the best effort-results ratio, producing a high number of healthy juveniles with little need for human intervention. According to this and other similar studies, captive bred juveniles should only be introduced in the natural environment after reaching a minimum total shell length of 1 mm. This “mixed method” allows mussels to be reared in controlled conditions

during the most critical stage of their development, and therefore maximize their survival rate in the natural environment. Although it is still necessary to clarify the impact of field cages on the development of freshwater pearl mussels, its use in *in-situ* experiments can be advantageous because it allows monitoring the survival and growth of juveniles and assessing the success of the conservation measures applied.

Keywords: Freshwater pearl mussel; Conservation; Captive breeding; Recruitment; Monitoring.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 O mexilhão-de-rio-do-norte (<i>Margaritifera margaritifera</i>) | 1 |
| 1.2 Conservação de <i>M. margaritifera</i> | 2 |
| 1.3 <i>M. margaritifera</i> em Portugal | 4 |
| 1.4 Enquadramento e objetivos da tese | 5 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 6 |
| 2.1 Obtenção e criação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> em cativeiro | 6 |
| 2.1.1 Sistema aberto | 7 |
| 2.1.2 Sistema fechado | 8 |
| 2.1.3 Sobrevivência e crescimento | 10 |
| 2.2 Comparação de dietas | 10 |
| 2.3 Criação de juvenis pós-parasíticos em sistemas de retenção no rio | 11 |
| 2.3.1 Área de estudo | 11 |
| 2.3.2 Experiência <i>in-situ</i> | 12 |
| 2.3.3 Caracterização do habitat | 13 |
| 2.3.4 Sobrevivência e crescimento | 13 |
| 2.3.5 Despiste do efeito do sistema de retenção | 14 |
| 2.4 Análise de dados | 14 |
| 3. RESULTADOS | 15 |
| 3.1 Sobrevivência e crescimento em cativeiro | 15 |
| 3.1.1 Sistema aberto | 15 |
| 3.1.2 Sistema fechado | 15 |
| 3.1.3 Comparação entre sistemas | 17 |
| 3.1.4 Comparação das taxas de crescimento e sobrevivência sob diferentes dietas | 18 |
| 3.2 Sobrevivência e crescimento no rio | 20 |
| 3.2.1 Condições do habitat | 20 |
| 3.2.2 Sobrevivência e crescimento | 21 |
| 3.2.3 Efeito do sistema de retenção no crescimento | 23 |
| 4. DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1 Desempenho dos sistemas artificiais | 24 |
| 4.1.1 Otimização do regime alimentar | 26 |
| 4.2 Desempenho do sistema semi-natural | 27 |
| 4.2.1 Efeito do sistema de retenção no crescimento | 29 |
| 5. CONCLUSÃO | 31 |
| 6. REFERÊNCIAS | 32 |
| 7. ANEXOS | 39 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 – Métodos de criação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> em cativeiro e alguns exemplos descritos na bibliografia. | 4 |
| Tabela 2.1 – Ensaios realizados com juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema fechado, definidos em função da semana de nascimento e comprimento inicial da concha. | 9 |
| Tabela 2.2 – Tipos de sistemas utilizados para criação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> e respectivas condições.... | 9 |
| Tabela 2.3 – Dietas testadas nos diferentes projetos de criação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> em cativeiro. ... | 11 |
| Tabela 2.4 – Indicadores populacionais (i.e. densidade, sobrevivência, recrutamento e crescimento individual e populacional) dos vários núcleos de <i>M. margaritifera</i> presentes no rio Beça (Garrido-López, dados não publicados). Valores médios (\pm desvio padrão). | 11 |
| Tabela 3.1 - Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento inicial e final para os juvenis de <i>M. margaritifera</i> de cada ensaio de sistema fechado e respetivo crescimento, ao fim de 6 semanas de vida. | 17 |
| Tabela 3.2 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> em função do recipiente, às 6 semanas de vida. | 17 |
| Tabela 3.3 – Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento máximo de concha inicial dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> por recipiente e respetivas taxas de sobrevivência e crescimento, às 6 semanas de vida. | 17 |
| Tabela 3.4 – Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento máximo de concha inicial e final dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema aberto e sistema fechado e respetiva taxa de crescimento, no período entre as 0 e 10 semanas de vida. | 18 |
| Tabela 3.5 – Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento máximo de concha e taxa de crescimento, entre as 2 e 7 semanas de vida, dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> alimentados com diferentes dietas. | 19 |
| Tabela 3.6 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha e taxa de crescimento às 7 semanas de vida dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> , em função da dieta. Sc – algas do género <i>Scenedesmus</i> , Sh+Na 15 – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 (2015), Sh+Na 20 – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 (2020), Sh+Na+D – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 + Detritos. | 20 |
| Tabela 3.7 – Características do habitat nos três locais de estudo no rio Beça, entre 17 e 24 de julho de 2020.... | 21 |
| Tabela 3.8 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> a crescer em <i>raceway</i> interior, em função do tipo de sistema de retenção (tubos ou areia) e do sistema em que foram criados: aberto (A) ou fechado (F). | 23 |
| Tabela 4.1 - Diferentes sistemas de retenção utilizados para a reintrodução de juvenis de <i>M. margaritifera</i> e respetivas taxas de sobrevivência. | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|---|
| Figura 1.1 - Representação simplificada do ciclo de vida de <i>Margaritifera margaritifera</i> , que envolve, obrigatoriamente, uma fase parasítica em salmonídeos juvenis. As larvas, designadas por gloquídeos, fixam-se nas brânquias dos hospedeiros, onde permanecem enquistadas até à conclusão do processo de metamorfose. Após libertação, os juvenis enterram-se na zona intersticial do sedimento (Hastie & Young, 2003a). | 2 |
| Figura 1.2 – Etapas principais em estratégias de conservação <i>ex-situ</i> de <i>M. margaritifera</i> (adaptado de Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010). | 3 |
| Figura 2.1 – Esquematização das diferentes fases do trabalho realizado e respetiva calendarização. | 6 |
| Figura 2.2 – Amostra de gloquídeos de uma fêmea de <i>M. margaritifera</i> (x35, lupa binocular; A) e pormenor do arco branquial de uma truta-de-rio infetada (x25, lupa binocular; B). | 7 |
| Figura 2.3 – Tanques cónicos para a recolha de juvenis de mexilhão-de-rio, com sistema de circulação fechada. A água do reservatório escoia para os copos de malha micrométrica, onde ficam retidos os juvenis, e posteriormente para o sistema de filtração, composto por tubos de cerâmica, ouriços bio-filtrantes e lâ de vidro, e finalmente é arrefecida num refrigerador antes de voltar ao reservatório. | 8 |

| | |
|--|----|
| Figura 2.4 – Medição do comprimento de concha de juvenis de <i>M. margaritifera</i> recém-libertados utilizando o software Leica Application Suite EZ®. | 10 |
| Figura 2.5 – Mapa da bacia hidrográfica do Rio Tâmega, na região norte de Portugal, com identificação dos três locais de criação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> em sistemas de retenção. | 12 |
| Figura 2.6 – Sistema de retenção para a colocação de juvenis de <i>M. margaritifera</i> no rio Beça. A – Tubos de rede micrométrica para a colocação e contenção de juvenis de mexilhão-de-rio. B – Cestos com grelha de fixação dos tubos. C – Cesto com juvenis, enterrado no substrato do rio. | 13 |
| Figura 3.1 – Comprimento de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema aberto (valores médios \pm desvio padrão), desde maio até ao final de setembro. A dimensão média dos juvenis com 4-10 semanas de vida representada no gráfico é inferior à dimensão real (ver secção 2.3.4). | 15 |
| Figura 3.2 – Taxa de sobrevivência dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> em cada ensaio de sistema fechado durante o período de cativeiro e número total de sobreviventes em todos os ensaios a cada semana. Os períodos de medição variam entre ensaios, de acordo com o intervalo semanal de nascimentos. | 16 |
| Figura 3.3 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados nos diferentes ensaios de sistema fechado em função da idade, com representação dos valores das medições individuais. Em cada <i>boxplot</i> , os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respetivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis outliers (pontos pretos de maior dimensão). | 16 |
| Figura 3.4 – Comprimento de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema aberto e sistema fechado, durante o período de medições coincidentes, com representação dos valores das medições individuais. Em cada <i>boxplot</i> , os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respetivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis outliers (pontos pretos de maior dimensão). | 18 |
| Figura 3.5 – Taxa de sobrevivência dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados com diferentes dietas até às 7 semanas de vida e número total de sobreviventes por semana. Não existem registos para os juvenis suplementados com detritos às 4 semanas de vida. | 19 |
| Figura 3.6 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema fechado sob diferentes dietas em função da idade. Em cada <i>boxplot</i> , os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respetivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis outliers (pontos pretos de maior dimensão). | 20 |
| Figura 3.7 – Potencial <i>redox</i> no substrato dos três locais de estudo no rio Beça, ao longo da experiência. | 21 |
| Figura 3.8 – Taxas de sobrevivência dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> introduzidos no rio (local 2), provenientes de sistema aberto e sistema fechado, em função das semanas de exposição às condições naturais. Em cada <i>boxplot</i> , os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respetivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. Os pontos pretos representam a taxa de sobrevivência de cada tubo e os pontos vermelhos a média do sistema. | 22 |
| Figura 3.9 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema aberto e sistema fechado em função do tempo de exposição ao meio natural, com representação dos valores das medições individuais. Em cada <i>boxplot</i> , os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respetivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. | 22 |
| Figura 3.10 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em <i>raceway</i> interior (em sistemas de retenção e em liberdade no substrato) em função do tempo de experiência, com representação das medições individuais. | 23 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Tabela 7.1 – Granulometria da areia utilizada como substrato de crescimento dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em <i>raceway</i> interior. | 39 |
| Tabela 7.2 – Calendarização dos momentos de medição dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em cativeiro, em sistema aberto e sistema fechado. | 39 |
| Tabela 7.3 – Variáveis ambientais avaliadas em cada local de estudo no rio Beça e respetiva contagem do número de medições por local de amostragem..... | 39 |
| Tabela 7.4 – Número de juvenis de <i>M. margaritifera</i> sobreviventes por recipiente de cada ensaio de sistema fechado e respetivo valor médio. | 40 |
| Figura 7.1 – Histogramas de distribuição de classes de comprimento máximo de concha, intervaladas de 50 μm , dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> criados em sistema fechado e sistema aberto. | 41 |
| Figura 7.2 – Histogramas de distribuição de classes de comprimento máximo de concha, intervaladas de 50 μm , dos juvenis de <i>M. margaritifera</i> de cada ensaio de sistema fechado. | 42 |

1. INTRODUÇÃO

Apesar de ocuparem menos de 1% da superfície da Terra, os ecossistemas de água doce constituem *hotspots* de biodiversidade, suportando cerca de 10% de todas as espécies conhecidas (Strayer & Dudgeon, 2010). Por outro lado, estes ecossistemas também são o foco de diversas atividades humanas, cujos impactos têm resultado na perda e degradação da qualidade do habitat e marcado declínio das espécies dulçaquícolas (Reid *et al.*, 2018).

Na Europa, os moluscos de água doce são o grupo biológico avaliado mais ameaçado, com 59% das espécies em risco de extinção (IUCN European Red List, 2019). Entre eles, destacam-se os mexilhões-de-rio (ordem Unionida), que desempenham um papel fundamental no funcionamento dos sistemas aquáticos e providenciam serviços de ecossistema valiosos que potenciam a biodiversidade (Cummings & Graf, 2009). Um dos principais serviços prestados por estes animais está relacionado com a sua ação depuradora, que contribui diretamente para a purificação da água, através da filtração de material suspenso. Outras funções incluem, por exemplo, a criação de habitat, nomeadamente suporte para algas e musgos, que atraem macroinvertebrados e outros organismos, e a reciclagem e translocação de nutrientes entre o substrato e a coluna de água. Por outro lado, muitas espécies desta ordem podem, também, ser utilizadas como indicadores biológicos, devido à sua ampla distribuição e elevada sensibilidade às condições do meio (Vaughn & Hakenkamp, 2001; Geist, 2010; Vaughn, 2018).

1.1 O mexilhão-de-rio-do-norte (*Margaritifera margaritifera*)

Uma das espécies da ordem Unionida mais emblemática é o mexilhão-de-rio-do-norte *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758), pertencente à família Margaritiferidae. Esta espécie está classificada como Criticamente Em Perigo na Europa pela UICN (União Internacional para a Conservação da Natureza; Moorkens, 2011) e protegida por vários tipos de instrumentos legais. Em particular, esta espécie está listada no Anexo III da Convenção de Berna e incluída nos Anexos II e V da Diretiva Habitats (Diretiva 92/43/CEE), o que exige a designação de Zonas Especiais de Conservação a favor da sua preservação, bem como a regulamentação da sua captura ou exploração na natureza.

O estatuto de ameaça de *M. margaritifera* deve-se, principalmente, ao declínio de mais de 90% das populações da Europa central, registado durante o século XX (Bauer, 1988; Moorkens, 2011). Esta tendência tem-se vindo a prolongar, sendo a ausência de recrutamento de juvenis nas populações naturais a causa principal desta redução (Geist, 2010). Isto está, em grande parte, associado à complexidade do seu ciclo de vida e grande sensibilidade ecológica.

Apesar de se poder reproduzir de modo hermafrodita em condições de baixa densidade populacional, *M. margaritifera* é uma espécie geralmente dióica (Bauer, 1987). A libertação de gâmetas masculinos para a coluna de água e a fecundação dos óvulos no interior do organismo das fêmeas ocorre durante o verão. Os embriões completam o desenvolvimento no marsúpio, após o que são libertados na coluna de água na forma de larvas parasíticas, designadas gloquídeos (Hastie & Young, 2003c; Skinner, Young & Hastie, 2003). Para completar o seu desenvolvimento, os gloquídeos fixam-se nas brânquias de hospedeiros específicos, designadamente o salmão *Salmo salar* ou a truta *Salmo trutta*, onde permanecem durante o inverno (Hastie & Young, 2001; Hastie & Young, 2003b). Concluído o processo de metamorfose, juvenis libertam-se do hospedeiro e estabelecem-se na zona hiporeica durante cerca de 5 anos (**Figura 1.1**). Inicialmente, os juvenis alimentam-se por *pedal feeding*, ou seja, por arrastamento de partículas alimentares com o pé para a boca, e posteriormente transitam para *filter feeding*, filtrando as partículas na coluna de água através das brânquias. Esta alteração depende do tamanho e não da idade do animal (Schartum *et al.*, 2017; Araujo *et al.*, 2018), pelo que o crescimento é crucial para o desenvolvimento e sobrevivência dos juvenis (Lange & Selheim, 2011; Lavictoire, 2016).

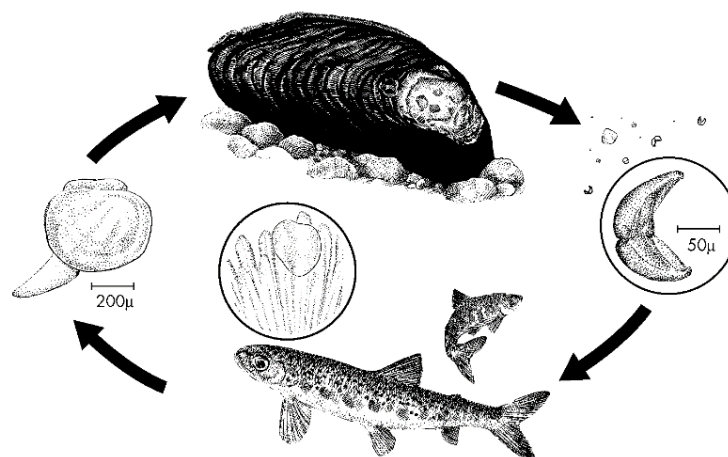


Figura 1.1 - Representação simplificada do ciclo de vida de *Margaritifera margaritifera*, que envolve, obrigatoriamente, uma fase parasítica em salmonídeos juvenis. As larvas, designadas por gloquídeos, fixam-se nas brânquias dos hospedeiros, onde permanecem enquistadas até à conclusão do processo de metamorfose. Após libertação, os juvenis enterram-se na zona intersticial do sedimento (Hastie & Young, 2003a).

Após o período de residência na zona hiporeica, os indivíduos de *M. margaritifera* estabelecem-se à superfície, onde permanecem semienterrados no substrato durante vários anos. *Margaritifera margaritifera* está entre as espécies de invertebrados com maior longevidade, frequentemente ultrapassando os 100 anos. A idade máxima atingida varia muito entre populações e parece depender, principalmente, das taxas de crescimento (Geist, 2010). Em comparação com as populações nórdicas, as populações meridionais apresentam uma maior taxa de crescimento e menor longevidade, que no caso das populações ibéricas atinge cerca de 60 anos (San Miguel *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2015). Populações com estas características tendem a ser particularmente vulneráveis à extinção, uma vez que o seu *output* reprodutivo, entendido como o número total de gloquídeos produzidos ao longo da vida, é menor (Bauer, 1991). Mesmo em populações com recrutamento, a taxa de mortalidade de gloquídeos e juvenis é muito elevada, ultrapassando os 90%. A espécie apresenta um período reprodutor longo, desde o momento em que atingem a maturidade sexual (em geral, por volta dos 10-20 anos) até à morte, e uma elevada capacidade de produção de gloquídeos, sendo que cada fêmea pode produzir entre 1 e 4 milhões de gloquídeos por cada ciclo (Young & Williams, 1984a; Bauer, 1987; Hastie & Young, 2003a).

De forma geral, *M. margaritifera* ocorre em rios de águas frias (<20°C), bem oxigenadas (>8 mg/L) e oligotróficas (baixo teor em nutrientes), em zonas com baixa profundidade, velocidade moderada e substrato de granulometria média, normalmente uma mistura de areia e cascalho com reduzida proporção de sedimentos finos. É comum encontrá-la próximo das margens, em zonas com vegetação ripícola bem desenvolvida (Hastie *et al.*, 2003; Varandas *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2015). Populações funcionais, isto é, com recrutamento, ocorrem, tipicamente, em habitats com elevado potencial *redox* (elevada disponibilidade de oxigénio), pouca ou nenhuma diferença entre a composição química da água corrente e a presente nos interstícios, e baixa proporção de sedimentos finos (Geist & Auerswald, 2007).

1.2 Conservação de *M. margaritifera*

Com a publicação da Diretiva de Habitats, em 1992, *M. margaritifera* foi identificada como espécie protegida, o que promoveu o desenvolvimento de diversas estratégias para a sua conservação (Lopes-Lima *et al.*, 2014; Lavictoire, 2016), geralmente distinguidas como medidas *in-situ* e *ex-situ*. Abordagens *in-situ* são, normalmente, aplicadas a populações mais abundantes e podem incluir a translocação de indivíduos adultos, a libertação de hospedeiros infetados com gloquídeos e o restauro de

habitats (Hastie & Young, 2003a). Muitas vezes, estas ações são realizadas em conjunto com abordagens *ex-situ*, especialmente quando as populações estão demasiado reduzidas ou envelhecidas. A conservação *ex-situ* de *M. margaritifera* envolve algumas ou todas as seguintes etapas: (1) fertilização de fêmeas em cativeiro, (2) infecção de peixes hospedeiros adequados, (3) recolha e (4) criação de juvenis pós-parasíticos (**Figura 1.2**; Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010).

Nas últimas décadas tem-se verificado um aumento do número de programas de reprodução em cativeiro desta espécie que envolvem a criação de juvenis pós-parasíticos em condições controladas durante a fase crítica de desenvolvimento e posterior libertação em meio natural (Gum, Lange & Geist, 2011), sendo que a principal vantagem deste método é a possibilidade de produzir um elevado número de juvenis que podem ser utilizados para recuperar populações em perigo (Preston, Keys & Roberts, 2007). Apesar de a fase pós-parasítica ser considerada basilar para a sobrevivência de *M. margaritifera*, ainda existe um conhecimento limitado acerca dos fatores que influenciam o desenvolvimento dos juvenis (Geist, 2010; Scheder *et al.*, 2015; Lavictoire, 2016).

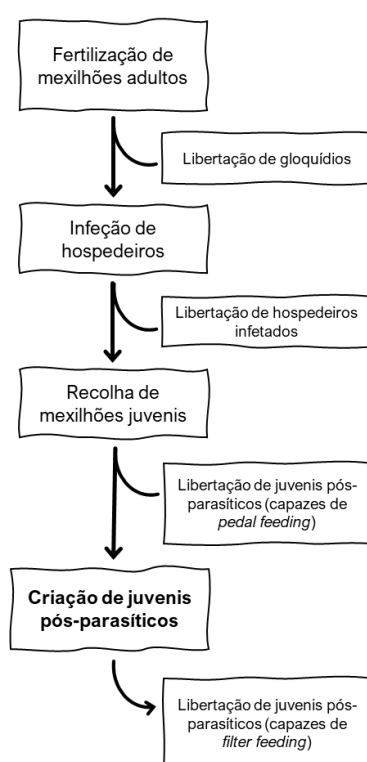


Figura 1.2 – Etapas principais em estratégias de conservação *ex-situ* de *M. margaritifera* (adaptado de Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010).

Os fatores mais importantes na criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro estão relacionados com a alimentação, substrato, fluxo de água e, conseqüentemente, oxigénio. Os vários métodos desenvolvidos envolvem diferentes combinações das condições proporcionadas, podendo agrupar-se em 3 tipos: sistemas artificiais fechados e abertos e sistemas semi-naturais (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1 – Métodos de criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro e alguns exemplos descritos na bibliografia.

| Sistema | Método | Exemplos | |
|--------------|---|---|--|
| Artificial | Sem circulação de água | Os juvenis são mantidos em pequenos recipientes sem circulação de água. Método laboratorial, bastante intensivo, que exige, limpeza dos recipientes e alimentação dos juvenis, regular. | Hruška, 1999; Eybe <i>et al.</i> , 2013; Scheder <i>et al.</i> , 2014; Araujo <i>et al.</i> , 2018 |
| | Fechado | Os juvenis são mantidos em reservatórios, como baldes ou tanques, com fluxo de água não-renovada (também conhecido como <i>recirculating system</i>). | O’Beim, Neves & Steg, 1998; Barnhart, 2006 |
| | Aberto | Os juvenis são criados em estruturas artificiais diretamente alimentadas por água do rio, ou outra massa de água natural (também conhecido como <i>flow-through system</i> .) Abordagem menos intensiva, que permite uma aproximação às condições naturais do habitat da espécie. | Preston, Keys & Roberts, 2007; Scriven <i>et al.</i> , 2011; Lavictoire <i>et al.</i> , 2015 |
| Semi-natural | Criação de juvenis em meio natural, através da utilização de sistemas de retenção (também conhecidos como <i>field cages</i>). | Buddensiek, 1995; Shmidt & Vandr , 2010; Kyle <i>et al.</i> , 2016; Denic, 2018 | |

A formulação de uma dieta ótima para a fase inicial de vida de juvenis pós-parasíticos de *M. margaritifera* é, ainda hoje, um desafio a ser ultrapassado, pois pouco se sabe acerca dos seus requisitos nutricionais (Araujo *et al.*, 2018). Após libertação do hospedeiro, os juvenis alimentam-se de algas e matéria orgânica, pelo que a maior parte das dietas desenvolvidas para criação em cativeiro incluem misturas de diferentes espécies de algas, marinhas ou de água doce, por vezes suplementadas com detritos ou proteína animal (Eybe *et al.*, 2013; Hua *et al.*, 2013).

Dentro dos sistemas artificiais, os sistemas abertos são os que melhor mimetizam as condições naturais da espécie, facilitando a concretização dos seus requisitos ecológicos e alimentares. No entanto, os sistemas fechados permitem um maior controlo dos parâmetros de sobrevivência e crescimento dos juvenis (Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010). Os sistemas semi-naturais, por sua vez, permitem monitorizar o desenvolvimento dos juvenis no ambiente natural, apesar de estes ficarem sujeitos às variações naturais das condições do habitat (Buddensiek, 1995; Denic, 2018).

1.3 *M. margaritifera* em Portugal

Em Portugal continental existem 50 espécies de moluscos de água doce, das quais 8 são exóticas. O grupo dos bivalves é composto por 18 espécies (Holyoak, Holyoak & Mendes, 2019; Catita *et al.*, 2020), das quais somente *Margaritifera margaritifera* e *Unio tumidiformis* estão legalmente protegidas.

O primeiro registo de ocorrência de *M. margaritifera* em Portugal foi feito no Rio Tâmega, por Morelet (1845). Mais tarde, Nobre (1941) cita a espécie noutros rios da bacia do Douro (rios Ferreira, Paiva, Sousa e no próprio Douro) e também nas bacias do Vouga (rio Ul) e Mira, sendo este último registo provavelmente um erro (Reis, 2003). Estes registos correspondem a observações pontuais de vários naturalistas, às quais se seguiu um longo período sem qualquer referência à espécie no país. Por esta razão, Young, Cosgrove & Hastie (2001) declararam que a espécie deveria ser considerada extinta no território português. No entanto, Reis (2003) veio confirmar a ocorrência de *M. margaritifera* nos rios Cávado, Paiva, Neiva, Mente, Rabaçal e Tuela, após um inventário a nível nacional. Mais tarde, Varandas *et al.* (2013) registaram duas novas populações na bacia do Tâmega, nos rios Terva e Beça. Atualmente, *M. margaritifera* está presente apenas em sete rios do norte de Portugal, tendo-se extinguido as populações dos rios Cávado e Terva (Sousa *et al.*, 2015; J. Reis, comunicação pessoal, 2020).

As populações portuguesas de *M. margaritifera* encontram-se ameaçadas pela perda e degradação do habitat, consequência da construção de barragens, da poluição e sedimentação dos cursos de água decorrente, principalmente, de más práticas agrícolas e florestais, bem como de incêndios; também são fatores impactantes a depleção do *stock* de salmonídeos e a introdução de espécies exóticas, como a ameijoira-asiática (*Corbicula fluminea*) (Reis, 2013; Sousa *et al.*, 2015; Ferreira-Rodríguez, Sousa & Pardo, 2018; Feio & Ferreira, 2019).

A persistência do mexilhão-de-rio-do-norte em Portugal depende da recuperação ambiental dos rios da sua área de distribuição, nomeadamente em termos de qualidade da água e regime hidrológico. Mas, até que existam condições favoráveis, a estabilização de populações em risco passa, necessariamente, pela implementação de um programa de reprodução em cativeiro (Reis, 2006; Lopes-Lima *et al.*, 2017).

Apesar de vários países terem já implementado programas de reprodução em cativeiro de *M. margaritifera* (Gum, Lange & Geist, 2011), o sucesso destes programas permanece pouco avaliado, devido à elevada longevidade da espécie e à dificuldade de deteção dos juvenis em meio natural, os quais são normalmente libertados sem qualquer sistema de localização ou identificação. Desconhece-se, em particular, se a *fitness* dos juvenis criados em cativeiro quando introduzidos em meio natural é equiparável à dos juvenis selvagens, condição necessária para a recuperação das populações (Thomas, Taylor & Garcia de Leaniz, 2010). O esclarecimento destas questões é fundamental para a otimização das técnicas de criação de *M. margaritifera* em cativeiro e, consequentemente, para a reabilitação das populações em risco.

1.4 Enquadramento e objetivos da tese

Recentemente, iniciou-se em Portugal o projeto “medidas de CONSERVAÇÃO E GESTÃO ORIENTADAS PARA O MEXILHÃO-DO-RIO (*Margaritifera margaritifera*)” (POSEUR 15-2018-03), que tem como objetivo reverter a situação da espécie a nível nacional. Entre outras ações, este projeto inclui um programa de reprodução em cativeiro da espécie, que servirá de base para um plano de reforços populacionais e repovoamentos. Este programa assenta na experiência internacional de programas semelhantes, assim como em ensaios prévios efetuados ao abrigo do projeto LIFE ECOTONE (LIFE10 NAT/PT/000073).

Esta tese foi desenvolvida em articulação com o programa de reprodução em cativeiro de *M. margaritifera* implementado no Posto Aquícola de Castrelos (Bragança, Portugal), no âmbito do projeto acima descrito. O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para a otimização das condições de criação dos juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro, através da comparação das taxas e sobrevivência e crescimento de juvenis submetidos a diferentes condições. Em particular, testaram-se diferentes sistemas de cultivo *ex-situ* – sistema fechado sem circulação de água e sistema aberto – e, posteriormente, avaliou-se a sua capacidade de produzir indivíduos resistentes e com elevada probabilidade de sobrevivência em meio natural, através da avaliação da sobrevivência e crescimento dos indivíduos criados em cada sistema quando reintroduzidos no rio. Para os indivíduos criados em sistema fechado, compararam-se os dados de sobrevivência e crescimento obtidos com os parâmetros alcançados em programas semelhantes utilizando diferentes dietas.

Espera-se que a taxa de crescimento *ex-situ* dos juvenis criados em sistema fechado seja inferior à dos juvenis criados em sistema aberto, que melhor mimetiza as condições naturais da espécie, nomeadamente no que diz respeito às condições de oxigenação, substrato e alimentação. Do mesmo modo, espera-se que as taxas de sobrevivência e crescimento *in-situ*, no rio, sejam mais elevadas em indivíduos criados em sistema aberto. Tendo em conta os resultados de experiências prévias, prevê-se que os melhores valores de sobrevivência e crescimento para juvenis criados em sistema fechado sejam obtidos para os indivíduos alimentados com uma mistura de algas suplementada com detritos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os juvenis de *M. margaritifera* utilizados neste trabalho foram obtidos através da extração de gloquídeos de adultos do rio Neiva (noroeste de Portugal), sendo que esta população foi selecionada para integrar o programa de reprodução em cativeiro devido ao seu reduzido efetivo populacional e à ausência de recrutamento (Reis, 2003; Sousa *et al.*, 2015). Estes juvenis foram sujeitos a experiências desenvolvidas em duas fases: (1) criação em cativeiro, em dois sistemas distintos, nas instalações do Posto Aquícola de Castrelos (Bragança, Portugal), alimentado pelo rio Baceiro (afluente do rio Tuela, bacia hidrográfica do Douro), e posterior (2) criação em sistema semi-natural, no rio Beça (afluente do rio Tâmega, bacia hidrográfica do Douro), através da utilização de sistemas de retenção (**Figura 2.1**).

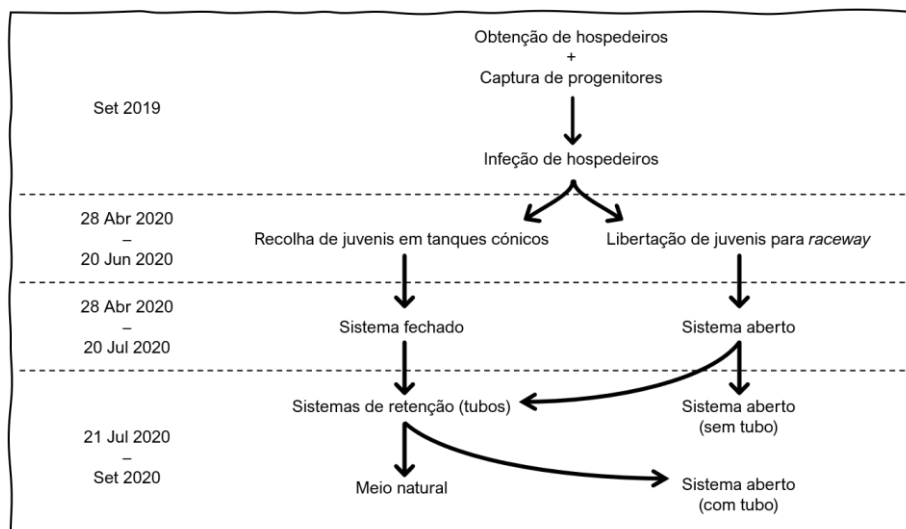


Figura 2.1 – Esquematização das diferentes fases do trabalho realizado e respetiva calendarização.

2.1 Obtenção e criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro

O programa de reprodução em cativeiro iniciou-se com a aquisição de 250 trutas-de-rio (*Salmo trutta*) 0+ (Hastie & Young, 2001; Taeubert, Gum & Geist, 2013). Estes indivíduos, originários do Posto Aquícola de Castrelos, foram instalados em tanques alongados com água corrente do rio em sistema aberto, de agora em diante designados por *raceways*. Estas, por sua vez, estão instaladas no exterior e, por isso, sujeitas às condições naturais de luz e temperatura.

No final de setembro de 2019 foram capturadas duas fêmeas grávidas de *M. margaritifera* no rio Neiva, distinguindo-se a presença de gloquídeos através do volume e coloração esbranquiçada das brânquias (Hastie & Young, 2003c). Estas fêmeas foram imediatamente transportadas para as instalações de Castrelos e sujeitas a stress respiratório, de forma a induzir a libertação de gloquídeos (Hastie & Young, 2003c), que ocorreu em menos de 24 horas após captura. Em laboratório, testou-se uma amostra de cerca de 50 gloquídeos de cada fêmea, através da sua exposição a uma solução salina, de forma avaliar a sua atividade global (Young & Williams 1984b; Jones, Mair & Neves, 2005). Após o teste, apenas uma das fêmeas apresentou gloquídeos aptos, tendo a sua carga larvar sido recolhida para infeção dos hospedeiros (**Figura 2.2-A**).

A infeção de trutas-de-rio ocorreu imediatamente após a recolha de gloquídeos ativos, de forma a maximizar a probabilidade de enquistamento. As 250 trutas-de-rio foram colocadas num balde (50 L) com água oxigenada através de uma bomba de ar e pedra difusora, ao qual se adicionou a totalidade de gloquídeos recolhidos, durante cerca de 15-30 minutos. O sucesso da operação foi confirmado através do sacrifício de 3 trutas e verificação da presença de gloquídeos nos arcos branqueais (**Figura 2.2-B**).

Cada indivíduo sacrificado continha cerca de 600 gloquídeos, permitindo a obtenção de um máximo de, aproximadamente, 150.000 juvenis de *M. margaritifera*.

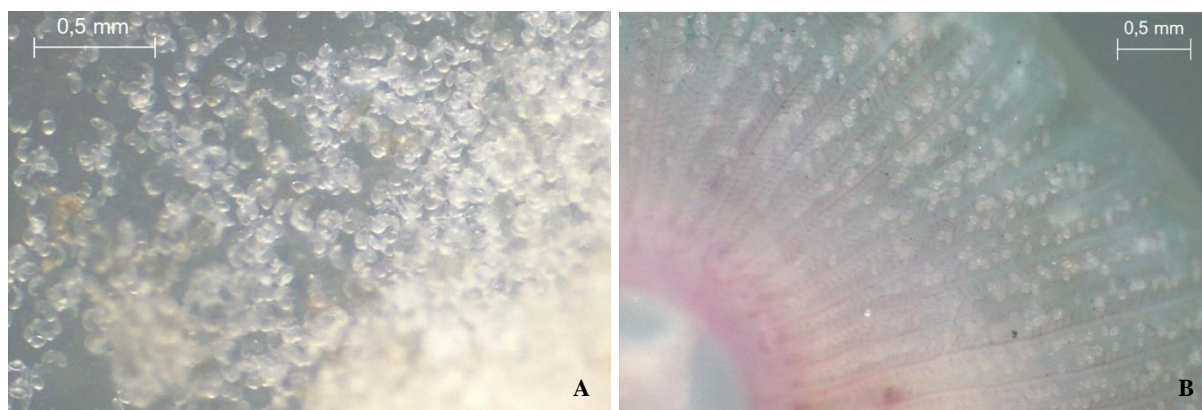


Figura 2.2 – Amostra de gloquídeos de uma fêmea de *M. margaritifera* (x35, lupa binocular; A) e pormenor do arco branquial de uma truta-de-rio infetada (x25, lupa binocular; B).

As trutas infetadas foram mantidas em *raceway* exterior durante todo o inverno e alimentadas diariamente com Alimento Completo para Trutas, maioritariamente composto por farinha de peixe. A temperatura da água foi registada diariamente e o valor de *day-degrees*, isto é, o somatório das temperaturas diárias da água desde o momento de infeção (Hruška, 1992), calculado de 15 em 15 dias. Estes registos permitiram prever o momento de libertação dos juvenis, que ocorre, normalmente, após cerca de 2000 *day-degrees* e imediatamente depois de um período de temperaturas superiores a 15°C (Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010; Taeubert, Gum & Geist, 2013).

2.1.1 Sistema aberto

O plano de trabalho inicial envolvia transferir todas as trutas-de-rio infetadas para tanques cónicos, desenhados especialmente para a recolha de juvenis de mexilhão-de-rio (**Figura 2.3**), e posteriormente distribuí-los pelos diferentes sistemas de cultivo. No entanto, com o aproximar da data prevista de libertação dos juvenis, e tendo em conta a incerteza de poder ter alguém a trabalhar no posto aquícola devido à situação de pandemia, foram adotadas medidas no sentido de garantir a sobrevivência de pelo menos uma parte dos juvenis libertados, sem necessidade de intervenção.

Assim, no dia 15 de abril de 2020 transferiram-se 100 trutas-de-rio para duas *raceways* interiores (50 trutas por *raceway*), que consistem em tanques de 400x40x40 cm, alimentados diretamente com água do rio que circula unidirecionalmente, em sistema aberto. Os tanques foram previamente equipados com areia (Anexos, **Tabela 7.1**), sobre a qual foi colocada uma rede, que serviram, respetivamente, como substrato para os juvenis se enterrarem e para evitar a sua predação pelas trutas-de-rio. Cerca de dois meses depois, no final do período de libertação de juvenis, as trutas-de-rio mantidas nas *raceways* foram removidas e transferidas para outro tanque, depois de se confirmar, por observação direta, que não apresentavam mais gloquídeos enquistados.

Os juvenis criados em sistema aberto foram mantidos no substrato, sem qualquer tipo de intervenção externa. Os tanques foram continuamente alimentados com água do rio, fornecendo alimento natural aos mexilhões juvenis. A temperatura da água foi registada diariamente.

Apesar de não ter sido possível controlar o momento inicial de libertação dos juvenis, assume-se que estes tenham nascido durante o mesmo período que os juvenis posteriormente obtidos nos tanques cónicos, uma vez que todos os hospedeiros foram mantidos em condições semelhantes.

2.1.2 Sistema fechado

No dia 27 de abril de 2020, 113 trutas-de-rio infetadas foram transferidas para dois tanques cónicos (**Figura 2.3**). A circulação de água nos tanques funcionou em sistema fechado e a temperatura foi mantida entre os 12-18°C com o auxílio de refrigeradores, de forma a mimetizar a temperatura da água do rio, e monitorizada diariamente. Os tanques foram equipados com crivos de malha de 200 µm, de forma a que os juvenis de *M. margaritifera* ficassem retidos com a saída da água.



Figura 2.3 – Tanques cónicos para a recolha de juvenis de mexilhão-de-rio, com sistema de circulação fechada. A água do reservatório escoa para os copos de malha micrométrica, onde ficam retidos os juvenis, e posteriormente para o sistema de filtração, composto por tubos de cerâmica, ouriços bio-filtrantes e lã de vidro, e finalmente é arrefecida num refrigerador antes de voltar ao reservatório.

Os primeiros juvenis foram detetados nos tanques cónicos a 28 de abril de 2020, 224 dias e 2085 *day-degrees* após a infeção dos hospedeiros. Os juvenis foram recolhidos diariamente, através da observação do conteúdo dos crivos numa lupa binocular (Leica EZ4 W®), até ao dia 20 de junho de 2020. Devido a problemas técnicos nos tanques de recolha, só foram recolhidos 2144 juvenis. Destes, só foram utilizados nas experiências desenvolvidas em sistema fechado 1900 indivíduos, nascidos entre os dias 28/04/2020 e 07/06/2020. No total foram desenvolvidos 4 ensaios experimentais (**Tabela 2.1**), iniciados a cada semana, usando os juvenis recolhidos nesse período de tempo. Em cada ensaio, os indivíduos foram divididos por recipientes plásticos com água do rio, em função do seu comprimento inicial, isto é, à nascença.

Na primeira semana de recolha de juvenis, entre os dias 28/04/2020 e 3/05/2020 só se libertaram 15 indivíduos, tendo estes sido incluídos no ensaio A, conjuntamente com os juvenis que nasceram na semana seguinte. Assim, de agora em diante, para padronização e análise de dados, assume-se que o período de libertação de juvenis teve início no dia 4 de maio e, consequentemente, uma duração aproximada de 6 semanas.

Tabela 2.1 – Ensaios realizados com juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema fechado, definidos em função da semana de nascimento e comprimento inicial da concha.

| Ensaio | Data de recolha | Recipiente | Dimensão inicial (µm) |
|--------|-----------------|------------|-----------------------|
| A | 04/05-10/05 | 1 | [200-250[|
| | | 2 | [250-300[|
| | | 3 | [300-350[|
| | | 4 | [350-400[|
| B | 11/05-17/05 | 1 | [200-250[|
| | | 2 | [250-300[|
| | | 3 | [300-350[|
| | | 4 | [350-400[|
| | | 5 | [400-450[|
| C | 18/05-24/05 | 1 | [200-250[|
| | | 2 | [250-300[|
| | | 3 | [300-350[|
| | | 4 | [350-400[|
| | | 5 | [400-450[|
| D | 01/06-07/06 | 2 | [250-300[|
| | | 3 | [300-350[|
| | | 4 | [350-400[|
| | | 5 | [400-450[|

Nota: Os indivíduos libertados entre 25/05/2020 e 31/05/2020 não foram incluídos nas experiências, devido a problemas técnicos.

Após a sua recolha, os juvenis foram mantidos em condições controladas em laboratório durante cerca de 3 meses, até ao início da experiência *in-situ*. Os recipientes foram colocados numa câmara térmica, mantida entre os 12°C-18°C, de forma a mimetizar a temperatura da água do rio. Os animais foram alimentados semanalmente com soluções de Shellfish Diet 1800®, que incluem uma mistura de *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros*, 4-20 µm, a 24.000 células/ml, e Nanno 3600®, que inclui *Nannochloropsis sp.*, 1-2 µm, a 1.836.000 células/ml (Reed Mariculture Inc. Campbell, California, USA). Estas algas são consideradas adequadas para o cultivo de bivalves de água doce, devido ao seu elevado conteúdo nutricional (Eybe *et al.*, 2013; Hua, Neves & Jiao, 2013). A água dos recipientes foi totalmente renovada uma vez por semana, e simultaneamente, removeram-se os indivíduos mortos e/ou infetados por fungos, possíveis predadores ou competidores e algum excesso de algas (Eybe *et al.*, 2013).

A **Tabela 2.2** resume os dois tipos de sistemas utilizados para criar os juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro.

Tabela 2.2 – Tipos de sistemas utilizados para criação de juvenis de *M. margaritifera* e respetivas condições.

| Sistema | Local de criação | Circulação de água | Substrato | Alimentação | Manutenção |
|---------|-----------------------|------------------------|-----------|----------------------------------|------------|
| Aberto | Raceway interior | Corrente unidirecional | Areia | Natural | Ausente |
| Fechado | Recipientes plásticos | Ausente | Ausente | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 | Semanal |

2.1.3 Sobrevivência e crescimento

Em sistema fechado, o número e o comprimento máximo da concha dos juvenis foram determinados semanalmente, aquando das operações de manutenção dos recipientes, para todos os ensaios durante, pelo menos, 6 semanas (Anexos, **Tabela 7.2**). Em sistema aberto não foi determinada a taxa de sobrevivência dos juvenis, uma vez que não foi contabilizado, à partida, o número de indivíduos libertados, e também porque seria impossível contar todos os indivíduos presentes no substrato sem modificar totalmente o sistema. Para determinar a dimensão média dos juvenis a crescer em *raceway*, foram recolhidas amostras em zonas com maior concentração de juvenis, determinadas a partir de análises prévias do substrato. A primeira amostragem foi feita no final do período de libertação dos juvenis, quando estes teriam entre 0 e 6 semanas de idade. Seguiram-se mais quatro amostragens semanais e uma última no final de setembro de 2020 (Anexos, **Tabela 7.2**).

Em ambos os sistemas, o comprimento máximo da concha foi determinado numa amostra de indivíduos, utilizando uma lupa binocular e o *software* Leica Application Suite EZ® (versão 3.4; **Figura 2.4**). Após as medições, os indivíduos criados em sistema aberto foram devolvidos às *raceways*.

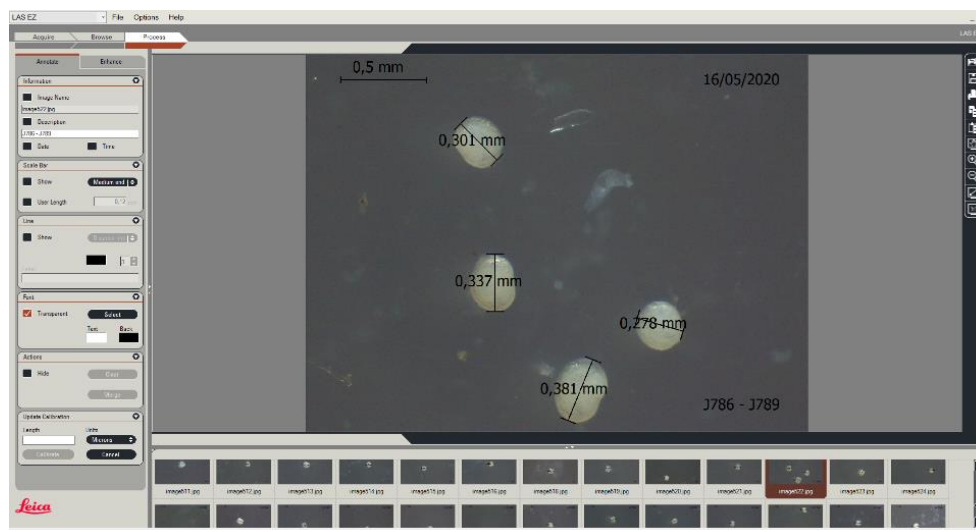


Figura 2.4 – Medição do comprimento de concha de juvenis de *M. margaritifera* recém-libertados, utilizando o *software* Leica Application Suite EZ®.

A taxa de sobrevivência dos juvenis em sistema fechado foi calculada como a proporção de sobreviventes em relação ao número total inicial de indivíduos em cada ensaio e recipiente. A taxa de crescimento dos juvenis de ambos os sistemas foi expressa como a proporção da dimensão média inicial pós-parasítica, isto é, à nascença. Os dois sistemas de criação de juvenis foram comparados durante o período de medições coincidentes, relativamente às respetivas taxas de crescimento, que foram calculadas como a proporção do comprimento médio dos juvenis no primeiro momento de medição.

2.2 Comparação de dietas

As taxas de sobrevivência e crescimento dos juvenis criados em sistema fechado durante este projeto foram comparadas com as calculadas para dados não publicados de outros programas de criação em cativeiro, implementados ao abrigo dos projetos LIFE ECOTONE (LIFE10 NAT/PT/00073; Quercus ANCN, 2015), desenvolvido no Posto Aquícola de Campelo (Leiria, Portugal) e LIFE Margal Ulla (LIFE09 NAT/ES/000514; Xunta de Galicia, 2015), desenvolvido em Veral (Galiza, Espanha). Ambos os projetos criaram juvenis de *M. margaritifera* em recipientes sem circulação de água, em

condições semelhantes às testadas neste projeto, mas utilizando diferentes tipos de dietas. Em Campelo foram testadas duas dietas, uma semelhante à utilizada neste estudo, e outra à base de algas do género *Scenedesmus*; em Veral, a dieta de algas foi suplementada com detritos recolhidos em lameiros (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3 – Dietas testadas nos diferentes projetos de criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro.

| Projeto | Local | Ano | Alimentação |
|-------------------|-----------|------|---|
| POSEUR 15-2018-03 | Castrelos | 2020 | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 |
| LIFE ECOTONE | Campelo | 2015 | <i>Scenedesmus</i> spp. Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 |
| LIFE Margal Ulla | Veral | 2015 | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 + detritos |

Os juvenis testados em Castrelos e Veral foram medidos desde a libertação do hospedeiro até às 8 semanas de vida, mas para os juvenis criados em Campelo só existem medições entre as 2-7 semanas. Assim, as taxas de crescimento e sobrevivência foram calculadas definindo-se como o momento inicial as 2 semanas de vida e momento final as 7 semanas.

2.3 Criação de juvenis pós-parasíticos em sistemas de retenção no rio

2.3.1 Área de estudo

O rio Beça foi selecionado como local de criação de juvenis de *M. margaritifera* em sistema semi-natural. Este rio é um afluente do Tâmega de dimensão média (46 km), em geral pouco afetado pela pressão humana, mantendo águas de boa qualidade e vegetação ripícola bem preservada. No entanto, existem algumas alterações ao nível da regulação do caudal e da conectividade do habitat, decorrentes da construção de barragens (Varandas *et al.*, 2013; Garrido-López, 2018). Para além disso, também se tem vindo a verificar um aumento da carga de sedimentos e nutrientes dissolvidos na água, devido a alterações do uso do solo e incêndios florestais (Santos *et al.*, 2015; Feio & Ferreira, 2019).

A população de *M. margaritifera* no rio Beça é considerada viável, apresentando evidências de recrutamento recente (Garrido-López, 2018). De acordo com a variação longitudinal das condições ecológicas e ambientais, podem distinguir-se três setores no rio Beça que mantêm núcleos populacionais de *M. margaritifera*, com características também distintas (Garrido-López, dados não publicados; **Tabela 2.4**).

Tabela 2.4 – Indicadores populacionais (i.e. densidade, sobrevivência, recrutamento e crescimento individual e populacional) dos vários núcleos de *M. margaritifera* presentes no rio Beça (Garrido-López, dados não publicados). Valores médios (\pm desvio padrão).

| Setor | População de <i>Margaritifera margaritifera</i> | | | | |
|----------|---|----------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Densidade (indiv./km) | Sobrevivência | Recrutamento | Crescimento individual (K) | Crescimento populacional |
| Montante | 20,67 | 0,920 (\pm 0,009) | 0,157 (\pm 0,025) | 0,138 | 1,080 (\pm 0,026) |
| Central | 234,71 | 0,933 (\pm 0,016) | 0,209 (\pm 0,050) | 0,065 | 1,139 (\pm 0,048) |
| Jusante | 90,79 | 0,885 (\pm 0,023) | 0,209 (\pm 0,042) | 0,085 | 1,046 (\pm 0,035) |

2.3.2 Experiência *in-situ*

A experiência *in-situ* foi realizada em três locais do rio Beça, considerados representativos de cada um dos setores de rio que mantêm núcleos distintos de *M. margaritifera* (**Figura 2.5**).

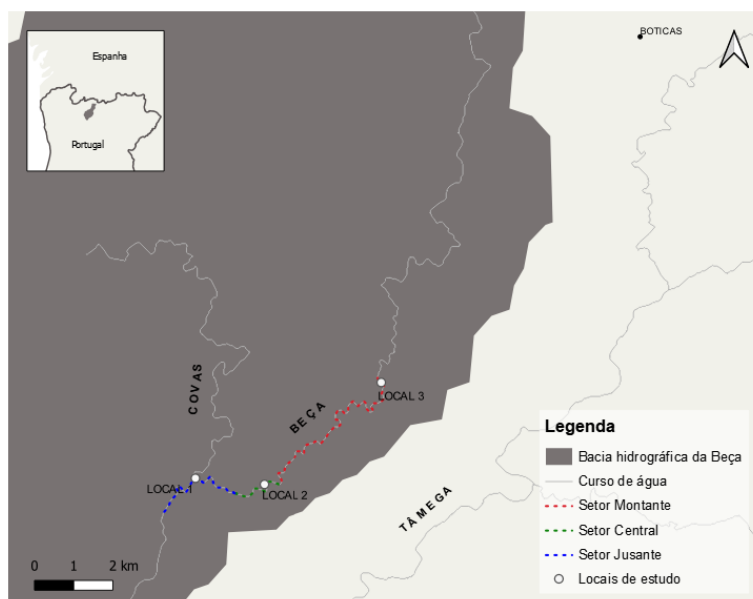


Figura 2.5 – Mapa da bacia hidrográfica do Rio Tâmega, na região norte de Portugal, com identificação dos três locais de criação de juvenis de *M. margaritifera* em sistemas de retenção.

Os juvenis foram colocados em sistemas de retenção, que consistem em tubos de rede de 250 μ m de malha, com 11 mm de diâmetro e 50 mm de altura, fechados com duas tampas amovíveis (**Figura 2.6-A**), que permitem o contacto dos animais com o ambiente envolvente e, ao mesmo tempo, impedem a sua fuga. Os tubos foram preparados em laboratório, começando com a colocação de substrato arenoso com 1-2 mm, até perfazer cerca de 80% do volume do tubo. Esta granulometria tem-se vindo a revelar adequada para o crescimento de juvenis de *M. margaritifera* (Lavictoire *et al.*, 2015; Bílý *et al.*, 2020) e, ao mesmo tempo, facilita a sua deteção. Antes de ser utilizada, a areia foi autoclavada a 120°C durante 60 minutos.

Em cada tubo foram introduzidos 10 juvenis de *M. margaritifera*. Durante este processo, os tubos foram mantidos na vertical, com o auxílio de uma grelha de fixação, num recipiente com água do rio. Depois de fechados, os tubos foram colocados numa geleira com água e transportados para o rio Beça. Durante a viagem (cerca de 2 horas), a geleira foi mantida aberta e, quando necessário, foram adicionadas placas de gelo, para evitar o aumento da temperatura da água. Já nos locais de estudo, os tubos foram acondicionados em cestos plásticos (26,5x17,5x13 cm; **Figura 2.6-B**) e enterrados no leito do rio, em zonas próximas da margem, com substrato arenoso, protegidas por vegetação ripícola, e onde ocorrem indivíduos adultos (**Figura 2.6-C**).



Figura 2.6 – Sistema de retenção para a colocação de juvenis de *M. margaritifera* no rio Beça. A – Tubos de rede micrométrica para a colocação e contenção de juvenis de mexilhão-de-rio. B – Cestos com grelha de fixação dos tubos. C – Cesto com juvenis, enterrado no substrato do rio.

Em cada local de estudo foi colocado um cesto com 10 tubos de juvenis criados em sistema aberto e 8 tubos de juvenis criados em sistema fechado. Esta desigualdade no número de tubos deveu-se ao número limitado de sobreviventes no sistema fechado à data do início da experiência no rio.

De forma a despistar o efeito da manipulação dos juvenis, foram selecionados três tubos de cada sistema, em cada local de estudo, cuja manipulação foi feita de forma a assegurar que em cada momento de manutenção se monitorizava um tubo não manipulado previamente.

2.3.3 Caracterização do habitat

No âmbito do projeto, foram recolhidos dados ambientais nos diferentes locais de estudo, entre os dias 17 e 24 de julho de 2020. Em cada local, ao longo de 25 metros, foram estabelecidos 6 transetos transversais, distanciados 5 metros. No total, foram avaliadas 12 variáveis ambientais que caracterizam o habitat de *M. margaritifera* (ver secção 1.1; Anexos, **Tabela 7.3**). O pH, a temperatura da água e a saturação de oxigénio foram medidos apenas num ponto, sendo o valor obtido considerado representativo de todo o local. A largura do rio e a cobertura vegetal foram medidas uma vez por transeto. A cobertura vegetal foi avaliada como a proporção do transeto coberto por vegetação. O potencial *redox* foi medido na coluna de água e a 5 cm de profundidade no substrato do leito em dois pontos de cada transecto. A profundidade, o tamanho do substrato e a velocidade da corrente da água foram medidos a cada metro ao longo dos vários transetos. A velocidade da corrente foi medida a 60% da profundidade, considerando-se esta medida como a velocidade média da corrente na coluna de água (Herschy, 2009). Foram ainda feitas medições adicionais da velocidade de corrente à superfície e junto ao leito, em alguns pontos. O tamanho do substrato foi medido como o maior comprimento das partículas do sedimento, de acordo com o método descrito por Bevenger & King (1995).

Durante o decorrer da experiência, entre 21/07/2020 e 01/09/2020, mediu-se a temperatura da água e o potencial *redox* no substrato no local exato onde se colocaram os tubos com os juvenis, com recurso a uma sonda ORP (WTW pH 3110).

2.3.4 Sobrevivência e crescimento

No dia 19 de julho de 2020, dois dias antes do início da experiência no campo, todos os indivíduos de *M. margaritifera* a testar em meio natural foram medidos, de forma a determinar o seu comprimento inicial. Para garantir que a dimensão inicial dos indivíduos era semelhante entre tratamentos, foram selecionados os indivíduos de sistema aberto com menor tamanho corporal

disponíveis. Consequentemente, nesta data, a dimensão média dos indivíduos a crescer em sistema aberto é manipulada, sendo superior ao valor apresentado.

Os juvenis criados em sistemas de retenção no rio foram monitorizados de 2 em 2 semanas. Depois de recolhidos os tubos e transportados para o laboratório, os indivíduos foram transferidos para uma placa de Petri para observação e medição, com o auxílio de uma lupa binocular (ver secção 2.1.3). Os juvenis mortos foram contabilizados e removidos, bem como possíveis predadores ou competidores, após o que os tubos foram recolocados no rio. Em situação de morte de todos os indivíduos presentes, os tubos foram removidos e eliminados. A taxa de detetabilidade média de juvenis nos tubos, calculada como a proporção de juvenis encontrados à lupa em relação ao número de indivíduos registados na manutenção anterior, foi de 95%.

Apesar de, inicialmente, terem sido planeadas 8 semanas de experiência *in-situ*, um evento geral de mortalidade às 6 semanas de trabalho antecipou a sua conclusão.

2.3.5 Despiste do efeito do sistema de retenção

Durante o período experimental em rio, foram mantidos na *raceway* interior, em Castrelos, quatro tubos com juvenis, dois de sistema aberto e dois de sistema fechado, de forma a despistar o efeito dos tubos no crescimento dos mexilhões. Para isso, comparou-se o seu crescimento com o dos juvenis criados em sistema aberto, a crescer em liberdade no substrato da *raceway*. A manutenção destes tubos foi feita simultaneamente com as operações de manutenção dos juvenis introduzidos no rio, através do mesmo procedimento.

2.4 Análise de dados

As taxas sobrevivência e crescimento dos juvenis foram analisadas com base em Modelos Lineares Generalizados (MLG), cuja função de distribuição foi definida como *binomial* ou *gaussian*, respetivamente. Sempre que necessário, na realização de comparações múltiplas, o nível de significância dos testes estatísticos foi ajustado utilizando a correção de Bonferroni.

As análises foram efetuadas no RStudio, versão 1.3.1093 (RStudio Team, 2020), utilizando a função *glm* do pacote *stats* e, para os testes *a posteriori*, a função *emmeans* do pacote *emmeans*. Para todas as análises, considerou-se um valor de *p* de 0,05 como o nível de significância estatística.

3. RESULTADOS

3.1 Sobrevivência e crescimento em cativeiro

3.1.1 Sistema aberto

No primeiro momento de medição, quando teriam 0-6 semanas de idade, os juvenis criados em *raceway* apresentaram um comprimento médio de 420,16 ($\pm 47,59$) μm e, ao fim de 14-20 semanas atingiram, em média, 747,08 ($\pm 120,62$) μm (177,81% do tamanho inicial). Nesta última medição detetou-se um indivíduo com mais de 1 milímetro de concha (**Figura 3.1**).

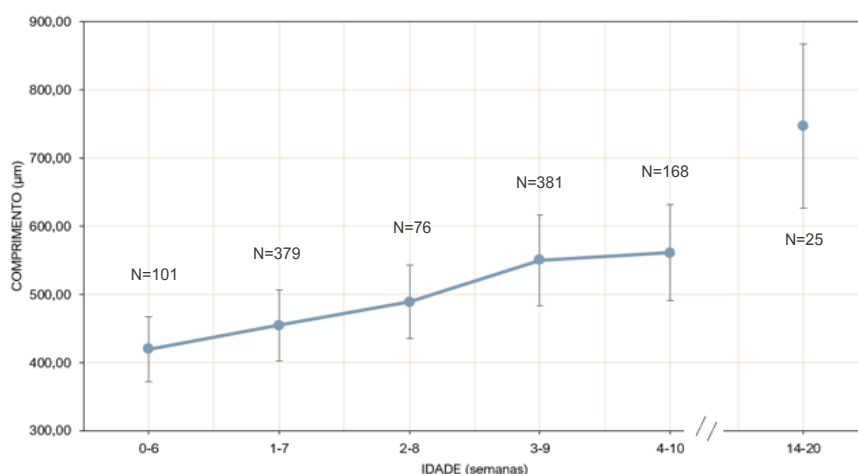


Figura 3.1 – Comprimento de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema aberto (valores médios \pm desvio padrão), desde maio até ao final de setembro. A dimensão média dos juvenis com 4-10 semanas de vida representada no gráfico é inferior à dimensão real (ver secção 2.3.4).

3.1.2 Sistema fechado

A mortalidade dos mexilhões juvenis mantidos em sistema fechado foi bastante elevada: dos 1900 indivíduos inicialmente considerados, apenas 289 (ou 15%) sobreviveram até ao final do período de cativeiro (cerca de 3 meses). Durante as primeiras 6 semanas de vida, a taxa de sobrevivência dos juvenis decresceu de forma contínua em todos os ensaios, atingindo um valor final entre 6 e 46% (**Figura 3.2**).

De forma geral, os juvenis parecem crescer de forma constante até atingirem as 5-6 semanas de vida, quando existe uma estabilização do comprimento médio. No ensaio B, a mortalidade abrupta de juvenis de menor dimensão levou ao aumento artificial do comprimento médio de concha (**Figura 3.3**). Ao fim de 6 semanas, os juvenis de *M. margaritifera* atingem, em média, um comprimento de concha de 450,30 ($\pm 50,53$) μm e um crescimento de 118,89 ($\pm 47,69$) μm face ao comprimento médio inicial (ou 136 $\pm 15\%$). A dimensão máxima atingida foi de 577 μm (176% do comprimento médio inicial). Apesar de a dimensão inicial ser diferente entre ensaios (GLM, $p < 0,05$), a taxa de crescimento foi semelhante entre tratamentos (GLM, $p = 1,00$; **Tabela 3.1**).

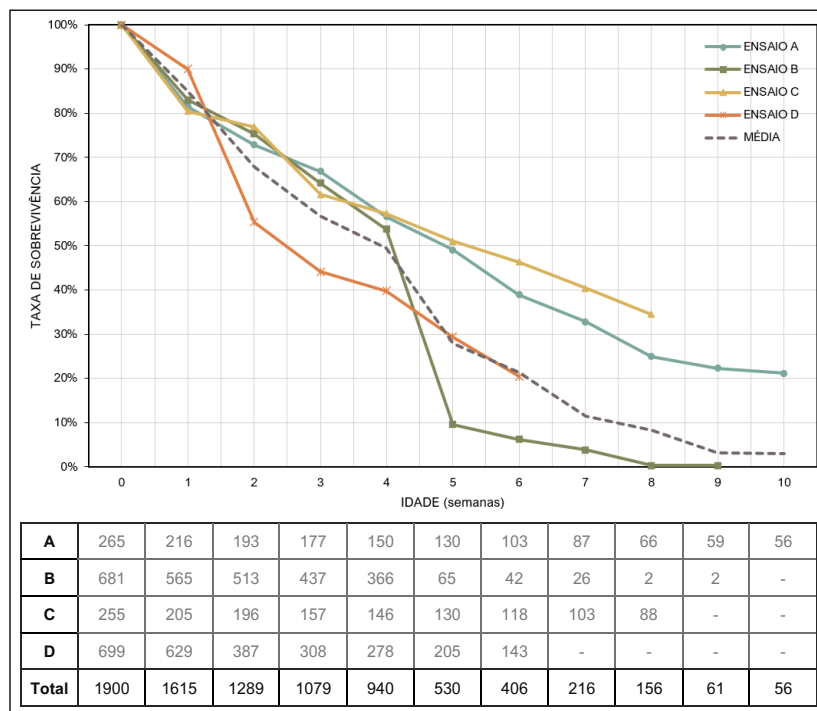


Figura 3.2 – Taxa de sobrevivência dos juvenis de *M. margaritifera* em cada ensaio de sistema fechado durante o período de cativo e número total de sobreviventes em todos os ensaios a cada semana. Os períodos de medição variam entre ensaios, de acordo com o intervalo semanal de nascimentos.

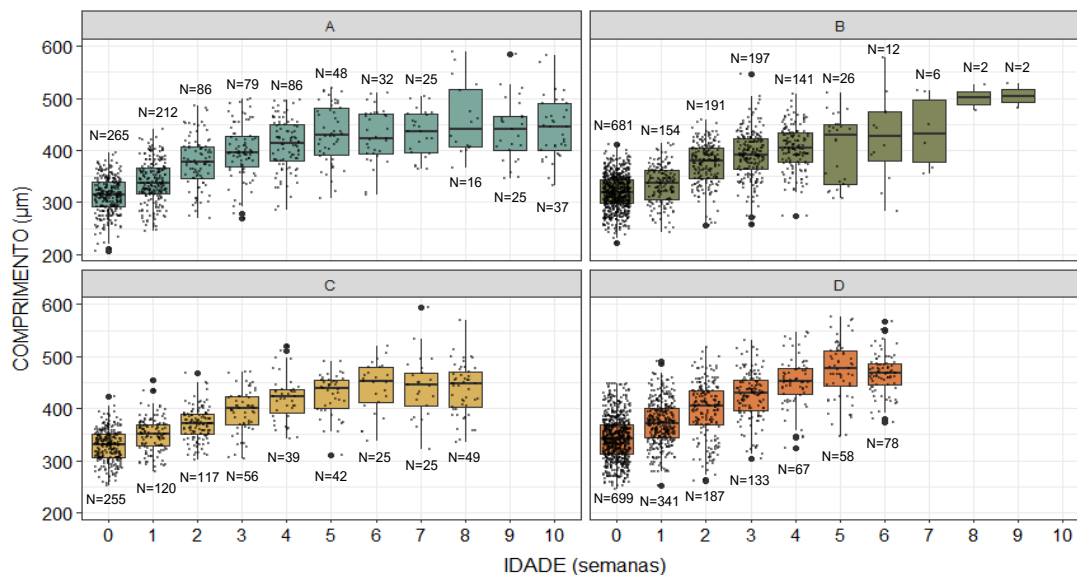


Figura 3.3 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados nos diferentes ensaios de sistema fechado em função da idade, com representação dos valores das medições individuais. Em cada *boxplot*, os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respetivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartil. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis *outliers* (pontos pretos de maior dimensão).

Tabela 3.1 - Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento inicial e final para os juvenis de *M. margaritifera* de cada ensaio de sistema fechado e respetivo crescimento, ao fim de 6 semanas de vida.

| Ensaio | Comprimento inicial (μm) | Comprimento final (μm) | Crescimento (μm) | Taxa de crescimento |
|--------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| A | 312,46 ($\pm 34,71$) | 428,41 ($\pm 50,72$) | 115,95 ($\pm 50,72$) | 1,37 ($\pm 0,16$) |
| B | 318,66 ($\pm 32,73$) | 422,50 ($\pm 83,84$) | 103,84 ($\pm 83,84$) | 1,33 ($\pm 0,26$) |
| C | 328,36 ($\pm 30,86$) | 441,36 ($\pm 48,86$) | 113,00 ($\pm 48,86$) | 1,34 ($\pm 0,15$) |
| D | 342,11 ($\pm 41,57$) | 466,42 ($\pm 38,18$) | 124,31 ($\pm 38,18$) | 1,36 ($\pm 0,11$) |

A dimensão à nascença dos juvenis foi significativamente diferente entre todos os recipientes (**Tabela 3.2**), mas não foi detetada nenhuma relação entre o comprimento inicial de concha e a taxa de sobrevivência final (às 6 semanas) (GLM, $\beta = 0,0114$, $p = 0,251$). Por outro lado, a dimensão à nascença teve um efeito negativo significativo na taxa de crescimento dos juvenis (GLM, $\beta = -0,0023$, $p < 0,001$; **Tabela 3.3**).

A densidade de juvenis variou entre recipientes, nunca ultrapassando os 200 juvenis por 100 mL de água (Anexos, **Tabela 7.4**). No entanto, este parâmetro não influenciou a taxa de sobrevivência (GLM, $\beta = -0,9226$, $p = 0,302$), nem a taxa de crescimento (GLM, $\beta = -0,0307$, $p = 0,696$) dos juvenis.

Tabela 3.2 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* em função do recipiente, às 6 semanas de vida.

| Recipientes | Comprimento (μm) | |
|-------------|-------------------------------|---------|
| | Coefficiente (β) | p |
| 1 – 2 | -32.0 | <0,0001 |
| 1 – 3 | -76.1 | <0,0001 |
| 1 – 4 | -118.9 | <0,0001 |
| 1 – 5 | -172.1 | <0,0001 |
| 2 – 3 | -44.1 | <0,0001 |
| 2 – 4 | -86.9 | <0,0001 |
| 2 – 5 | -140.1 | <0,0001 |
| 3 – 4 | -42.8 | <0,0001 |
| 3 – 5 | -96.1 | <0,0001 |
| 4 – 5 | -53.3 | <0,0001 |

Tabela 3.3 – Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento máximo de concha inicial dos juvenis de *M. margaritifera* por recipiente e respetivas taxas de sobrevivência e crescimento, às 6 semanas de vida.

| Recipiente | Classe (μm) | Comprimento inicial (μm) | Comprimento final (μm) | Taxa de sobrevivência | Taxa de crescimento |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 1 | [200-250[| 248,32 ($\pm 26,68$) | 402,33 ($\pm 12,86$) | 0,15 ($\pm 0,27$) | 1,61 ($\pm 0,05$) |
| 2 | [250-300[| 280,32 ($\pm 15,54$) | 414,08 ($\pm 73,60$) | 0,28 ($\pm 0,23$) | 1,48 ($\pm 0,26$) |
| 3 | [300-350[| 324,41 ($\pm 14,68$) | 422,93 ($\pm 37,11$) | 0,20 ($\pm 0,22$) | 1,30 ($\pm 0,12$) |
| 4 | [350-400[| 367,21 ($\pm 13,20$) | 468,12 ($\pm 28,88$) | 0,40 ($\pm 0,27$) | 1,27 ($\pm 0,08$) |
| 5 | [400-450[| 420,46 ($\pm 14,21$) | 494,15 ($\pm 43,83$) | 0,61 ($\pm 0,42$) | 1,18 ($\pm 0,10$) |

3.1.3 Comparação entre sistemas

O comprimento de concha dos juvenis criados em sistemas diferentes distingue-se logo a partir do período de 0-6 semanas de vida, sendo que os indivíduos criados em sistema aberto apresentam um comprimento de concha superior (GLM, $\beta_{\text{Aberto} - \text{Fechado}} = 15,704$, $p = 0,011$; **Figura 3.4**). No final do

período de cativeiro, quando os juvenis tinham 4 a 10 semanas, a taxa de crescimento foi significativamente diferente entre os dois sistemas (GLM, $\beta_{\text{Aberto} - \text{Fechado}} = 0.2166$, $p < 0,0001$), sendo que os indivíduos do sistema aberto apresentaram um incremento em tamanho três vezes superior aos de sistema fechado (**Tabela 3.4**). Em sistema aberto observou-se um aumento constante do comprimento máximo da concha dos juvenis e um aumento da frequência das classes de maior dimensão; no sistema fechado, verificou-se a prevalência das classes dimensionais médias, sendo que, na última semana de medição houve uma redução da dimensão média, consequência da morte de indivíduos de maior dimensão ou da estabilização do crescimento (Anexos, **Figura 7.1**).

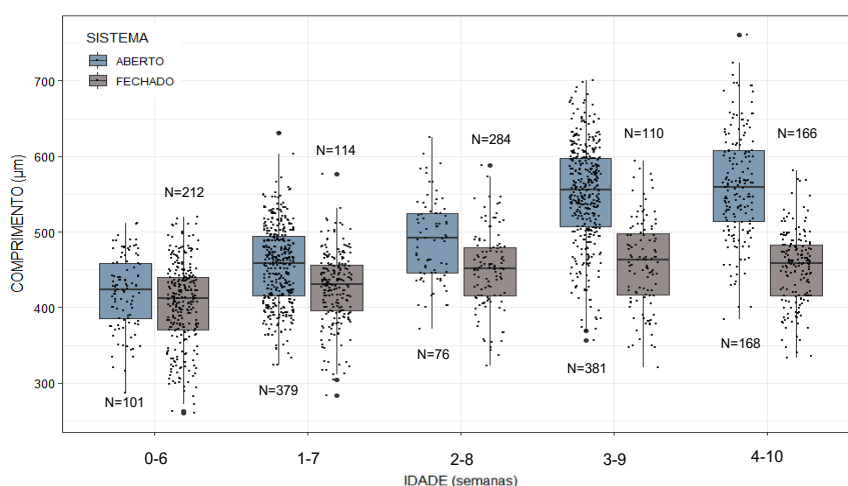


Figura 3.4 – Comprimento de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema aberto e sistema fechado, durante o período de medições coincidentes, com representação dos valores das medições individuais. Em cada *boxplot*, os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respectivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartil. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis *outliers* (pontos pretos de maior dimensão).

Tabela 3.4 – Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento máximo de concha inicial e final dos juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema aberto e sistema fechado e respetiva taxa de crescimento, no período entre as 0 e 10 semanas de vida.

| Sistema | Comprimento inicial (μm) | Comprimento final (μm) | Crescimento (μm) | Taxa de crescimento |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Aberto | 420,16 ($\pm 47,59$) | 561,49 ($\pm 69,99$) | 141,34 ($\pm 69,99$) | 1,34 ($\pm 0,17$) |
| Fechado | 404,45 ($\pm 54,47$) | 452,92 ($\pm 48,45$) | 48,47 ($\pm 48,45$) | 1,12 ($\pm 0,12$) |

3.1.4 Comparação das taxas de crescimento e sobrevivência sob diferentes dietas

Em termos gerais, os juvenis alimentados com algas e detritos distinguem-se dos restantes pela elevada taxa de sobrevivência – 96% ao fim de 7 semanas de vida –, enquanto os indivíduos alimentados com *Scenedesmus* spp. apresentam uma taxa de sobrevivência de 5%. Os juvenis alimentados com a mistura de algas Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 atingiram taxas de sobrevivência semelhantes nos dois anos (**Figura 3.5**).

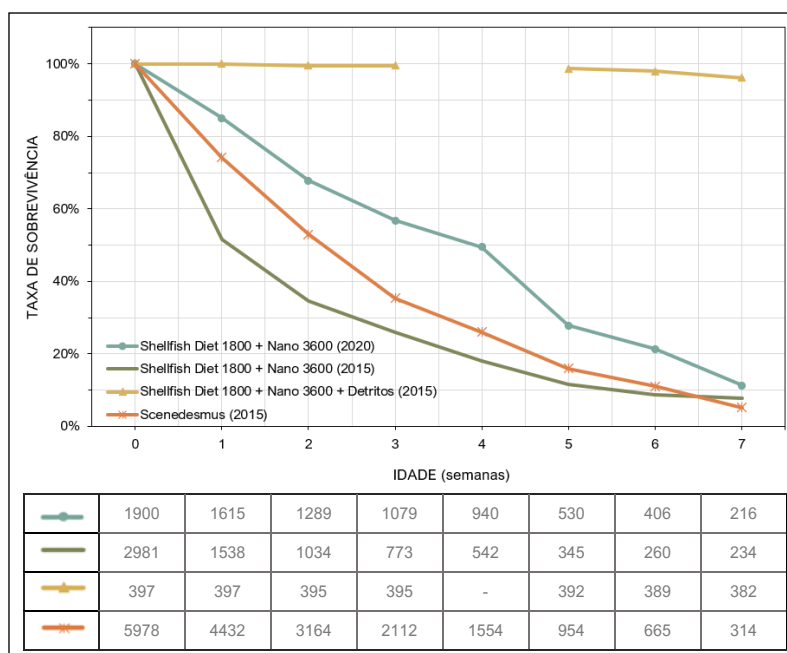


Figura 3.5 – Taxa de sobrevivência dos juvenis de *M. margaritifera* criados com diferentes dietas até às 7 semanas de vida e número total de sobreviventes por semana. Não existem registos para os juvenis suplementados com detritos às 4 semanas de vida.

O mesmo padrão é observado em termos de crescimento, em que os juvenis alimentados com algas do género *Scenedesmus* crescem apenas 28,42 ($\pm 40,70$) μm , enquanto os juvenis suplementados com detritos crescem mais de 200 ($\pm 92,44$) μm ao fim de 7 semanas, produzindo indivíduos com quase 1 mm ao fim de apenas 2 meses. Para a dieta Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600, os juvenis criados em Castrelos (2020) parecem crescer inicialmente melhor do que os indivíduos testados em Campelo (2015), no entanto, a partir das 6 semanas, o comprimento de concha estabiliza e, consequentemente, a taxa de crescimento atingida é menor (**Tabela 3.5, Figura 3.6**).

A taxa de crescimento dos juvenis alimentados com algas e detritos é significativamente superior à obtida com todas as outras dietas testadas, enquanto a taxa de crescimento dos juvenis alimentados com *Scenedesmus* spp. é significativamente menor do que a dos restantes tratamentos com exceção da obtida neste trabalho (**Tabela 3.6**).

Tabela 3.5 – Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento máximo de concha e taxa de crescimento, entre as 2 e 7 semanas de vida, dos juvenis de *M. margaritifera* alimentados com diferentes dietas.

| Dados | Ano | Alimentação | Comprimento final (μm) | Taxa de crescimento |
|-----------|------|---|-------------------------------------|---------------------|
| Castrelos | 2020 | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 | 437,38 ($\pm 52,71$) | 1,15 ($\pm 0,14$) |
| | | Scenedesmus | 360,93 ($\pm 40,70$) | 1,09 ($\pm 0,12$) |
| Campelo | 2015 | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 | 469,72 ($\pm 62,48$) | 1,31 ($\pm 0,17$) |
| Veral | 2015 | Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 + Detritos | 573,01 ($\pm 92,44$) | 1,55 ($\pm 0,25$) |

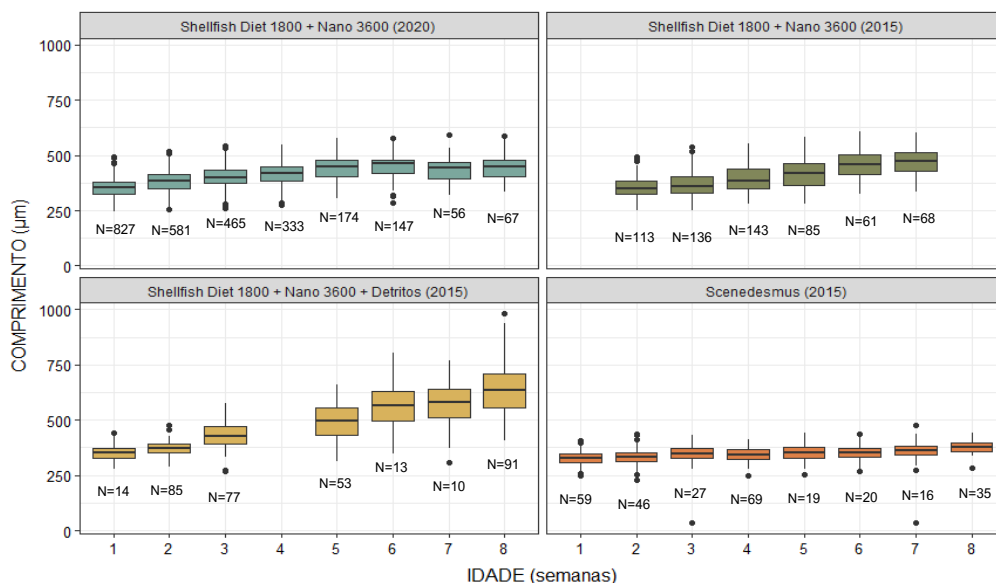


Figura 3.6 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema fechado sob diferentes dietas em função da idade. Em cada *boxplot*, os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respectivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartil. Valores além do final dos bigodes são considerados possíveis *outliers* (pontos pretos de maior dimensão).

Tabela 3.6 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha e taxa de crescimento às 7 semanas de vida dos juvenis de *M. margaritifera*, em função da dieta. Sc – algas do género *Scenedesmus*, Sh+Na 15 – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 (2015), Sh+Na 20 – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 (2020), Sh+Na+D – Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 + Detritos.

| Dieta | Comprimento final (µm) | | Taxa de crescimento | |
|---------------------|------------------------|---------|---------------------|---------|
| | Coefficiente (B) | p | Coefficiente (B) | p |
| Sc – Sh+Na 15 | -108,8 | <0,0001 | -0,2272 | <0,0001 |
| Sc – Sh+Na 20 | -76,4 | <0,0001 | -0,0622 | 0,1347 |
| Sc – Sh+Na+D | -212,1 | <0,0001 | -0,4684 | <0,0001 |
| Sh+Na 15 – Sh+Na 20 | 32,3 | 0,0282 | 0,1650 | <0,0001 |
| Sh+Na 15 – Sh+Na+D | -103,3 | <0,0001 | -0,2412 | <0,0001 |
| Sh+Na 20 – Sh+Na+D | -135,6 | <0,0001 | -0,4062 | <0,0001 |

3.2 Sobrevivência e crescimento no rio

3.2.1 Condições do habitat

As condições de habitat nos três locais de estudo, entre 17 e 24 de julho de 2020, são apresentadas na **Tabela 3.7**. O local 2, incluído no setor do rio Beça com maior densidade de indivíduos de *M. margaritifera* (ver secção 2.3.3), destaca-se dos restantes pela abundante cobertura vegetal, velocidade de corrente moderada, substrato com maior granulometria e maior potencial *redox* no substrato. Para além disso, este local apresenta também a menor diferença de potencial *redox* entre a coluna de água e o substrato.

Na **Figura 3.7** está evidenciada a variação do potencial *redox* no substrato em cada local de estudo, entre 21/07/2020 e 01/09/2020, com redução acentuada nos locais 1 e 3 logo na segunda semana de trabalho e no local 2 ao fim de 6 semanas.

Tabela 3.7 – Características do habitat nos três locais de estudo no rio Beça, entre 17 e 24 de julho de 2020.

| Parâmetro | | Local 3 | Local 2 | Local 1 |
|------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| pH | | 6,75 | 6,87 | 6,86 |
| Temperatura da água (°C) | | 15,80 | 16,10 | 16,60 |
| Saturação de oxigénio (%) | | 91,20 | 105,40 | 98,00 |
| Cobertura vegetal (%) | | 68,19 ($\pm 17,46$) | 98,38 ($\pm 2,37$) | 80,75 ($\pm 11,81$) |
| Largura do rio (m) | | 10,35 ($\pm 0,49$) | 7,34 ($\pm 0,78$) | 11,80 ($\pm 0,56$) |
| Profundidade (cm) | | 48,12 ($\pm 17,45$) | 42,45 ($\pm 20,93$) | 22,67 ($\pm 17,19$) |
| Velocidade da corrente (m/s) | Superfície | 0,08 ($\pm 0,09$) | 0,19 ($\pm 0,26$) | 0,43 ($\pm 0,49$) |
| | 60% | 0,01 ($\pm 0,04$) | 0,09 ($\pm 0,16$) | 0,43 ($\pm 0,51$) |
| | Fundo | 0,01 ($\pm 0,04$) | 0,06 ($\pm 0,14$) | 0,20 ($\pm 0,30$) |
| Dimensão substrato (mm) | | 56,53 ($\pm 71,96$) | 177,35 ($\pm 210,49$) | 27,73 ($\pm 27,01$) |
| Potencial <i>redox</i> (mV) | Coluna de água | 398,23 ($\pm 21,52$) | 386,53 ($\pm 15,61$) | 353,83 ($\pm 17,47$) |
| | Substrato | 325,19 ($\pm 58,28$) | 359,26 ($\pm 51,25$) | 288,58 ($\pm 57,46$) |

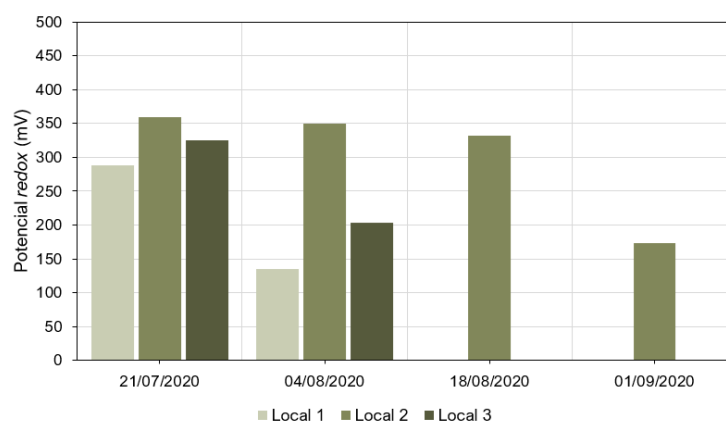


Figura 3.7 – Potencial *redox* no substrato dos três locais de estudo no rio Beça, ao longo da experiência.

3.2.2 Sobrevivência e crescimento

Duas semanas após a colocação dos sistemas de retenção no rio, todos os juvenis do local 1 e do local 3 morreram. No local 2, ao fim de 4 semanas, a taxa de sobrevivência média foi de 30% para os indivíduos provenientes do sistema aberto e 7% para os indivíduos provenientes do sistema fechado (**Figura 3.8**). No entanto, não foram detetadas diferenças significativas na taxa de sobrevivência entre sistemas (GLM, $\beta_{\text{Aberto-Fechado}}=1,7918$ $p=0,322$).

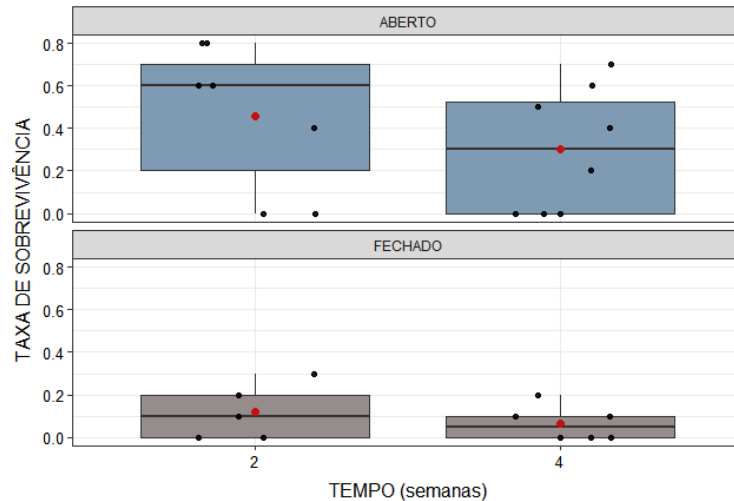


Figura 3.8 – Taxas de sobrevivência dos juvenis de *M. margaritifera* introduzidos no rio (local 2), provenientes de sistema aberto e sistema fechado, em função das semanas de exposição às condições naturais. Em cada *boxplot*, os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respectivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis. Os pontos pretos representam a taxa de sobrevivência de cada tubo e os pontos vermelhos a média do sistema.

Os juvenis de sistema aberto apresentaram, desde o início da experiência *in-situ*, um comprimento de concha superior aos de sistema fechado (GLM, $\beta_{\text{Aberto-Fechado}}=42,033$, $p<0,001$). A elevada mortalidade dos juvenis de sistema fechado não permitiu avaliar o seu crescimento. No sistema aberto não existem diferenças significativas entre os comprimentos médios inicial e final (GLM, $\beta_{\text{Inicial-Final}}=-0,5667$, $p=0,927$), evidenciando a ausência de crescimento considerável destes juvenis (**Figura 3.9**). Ao fim de 6 semanas, todos os juvenis introduzidos no local 2 foram encontrados mortos.

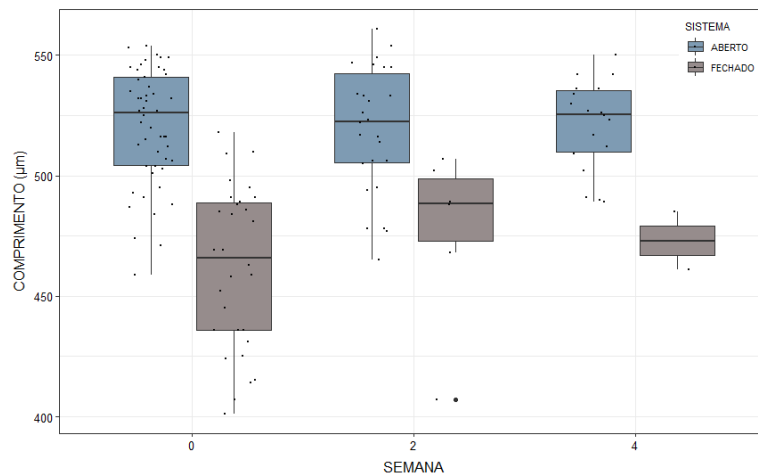


Figura 3.9 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados em sistema aberto e sistema fechado em função do tempo de exposição ao meio natural, com representação dos valores das medições individuais. Em cada *boxplot*, os limites inferior e superior da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha preta dentro da caixa marca a mediana; os traços superiores e inferiores (bigodes) estendem-se até ao valor máximo e mínimo, respectivamente, nunca ultrapassando 1,5 vezes o intervalo interquartis.

3.2.3 Efeito do sistema de retenção no crescimento

Durante o período de estudo, os juvenis a crescer em liberdade no substrato da *raceway* cresceram $238,63 (\pm 120,62) \mu\text{m}$, enquanto os juvenis mantidos em tubos cresceram apenas $21,70 (\pm 30,43) \mu\text{m}$ (**Figura 3.10**). Assim, ao fim de cerca de 2 meses, os indivíduos criados livremente na *raceway* apresentaram uma dimensão significativamente superior à dos seus homólogos mantidos em tubos (**Tabela 3.8**).

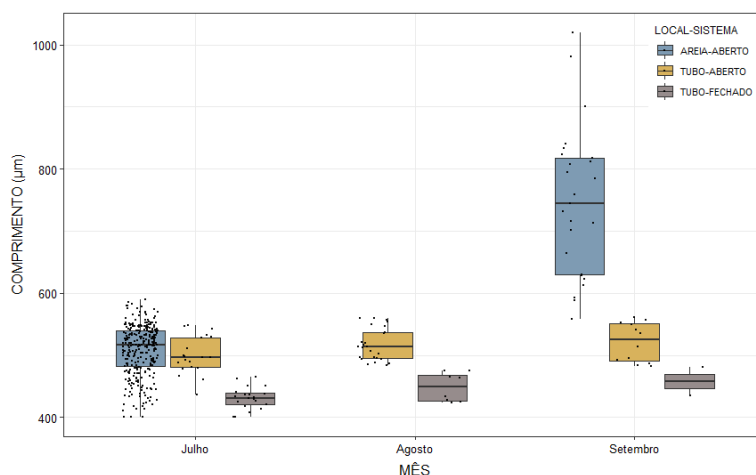


Figura 3.10 – Comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* criados em *raceway* interior (em sistemas de retenção e em liberdade no substrato) em função do tempo de experiência, com representação das medições individuais.

Tabela 3.8 – Resultados do Modelo Linear Generalizado da variação do comprimento máximo de concha dos juvenis de *M. margaritifera* a crescer em *raceway* interior, em função do tipo de sistema de retenção (tubos ou areia) e do sistema em que foram criados: aberto (A) ou fechado (F).

| Variável 1 | | Variável 2 | | Comprimento de concha (μm) | |
|------------|-----------|------------|-----------|---|----------|
| Momento | Sistema | Momento | Sistema | Coefficiente | <i>p</i> |
| Inicial | Areia – A | Final | Areia – A | -238,6 | <0,0001 |
| Inicial | Tubo – A | Final | Tubo – A | -20,8 | 1,000 |
| Inicial | Tubo – F | Final | Tubo – F | -27,2 | 1,000 |
| Inicial | Areia – A | Inicial | Tubo – A | 8,4 | 1,000 |
| Final | Areia – A | Final | Tubo – A | 226,2 | <0,0001 |

4. DISCUSSÃO

A principal vantagem da criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro é a possibilidade de, a partir de poucos adultos, se obter um grande número de indivíduos saudáveis e resistentes que podem ser reintroduzidos em meio natural, mas também o facto de se poder obter juvenis de populações em que, por razões várias (ausência de hospedeiros, condições ambientais inapropriadas, entre outras), não existe recrutamento. Dos métodos artificiais de criação em cativeiro testados neste trabalho, o sistema aberto revelou-se o melhor em termos de esforço-resultados, sendo que, 3 meses depois do início do período de libertação dos juvenis, estes indivíduos cresceram significativamente mais do que os criados em sistema fechado, apresentando um incremento do comprimento de concha três vezes superior. Ainda assim, a criação de juvenis em sistema fechado permitiu comparar a adequabilidade de diferentes dietas, concluindo-se que a sobrevivência e crescimento dos juvenis são maximizados com uma mistura de algas suplementada com detritos. Depois de os juvenis serem introduzidos em condições semi-naturais, não foi possível comparar a sobrevivência e crescimento dos juvenis provenientes dos dois sistemas artificiais, devido à mortalidade elevada. Esta foi consequência de perturbações ambientais nos diferentes locais de estudo, nomeadamente no que diz respeito às condições de oxigenação do meio intersticial.

4.1 Desempenho dos sistemas artificiais

O declínio das populações portuguesas de *Margaritifera margaritifera* está, atualmente, a ser combatido através da implementação de medidas dirigidas à conservação e recuperação do seu habitat. No entanto, a maior parte das populações já não apresenta recrutamento natural ou possui efetivos suficientes para evitar o seu declínio e, nestes casos, as medidas dirigidas aos habitats devem ser complementadas com programas de reprodução e criação de juvenis em cativeiro, para utilização em reforços populacionais e repovoamentos. O sucesso deste tipo de programas está fortemente dependente da taxa de sobrevivência dos juvenis durante a fase inicial pós-parasítica, sendo que, nos primeiros meses após libertação do hospedeiro, a mortalidade dos juvenis é geralmente elevada, tanto em cativeiro como na natureza (Gum, Lange & Geist, 2011).

A estratégia adotada neste trabalho para criar juvenis de *M. margaritifera* em sistema aberto permitiu que estes se libertassem naturalmente para o substrato e crescessem em condições próximas às naturais, sem intervenção humana. De forma geral, a utilização de sistemas abertos permite a criação de juvenis em grande escala, garantindo elevadas taxas de sobrevivência durante vários meses (Preston, Keys & Roberts, 2007; Scriven *et al.*, 2011; Lavictoire *et al.*, 2015). Neste trabalho não foi possível avaliar a taxa de sobrevivência dos juvenis, no entanto, constatou-se que atingiram um comprimento máximo de concha de 558 a 1020 μm após cerca de 5 meses, sendo que estes valores são superiores aos obtidos nas experiências acima referenciadas. Os fatores que contribuem para esse sucesso incluem, provavelmente, o fluxo contínuo de água bem oxigenada e o fornecimento de uma camada de sedimentos para reter alimento e para os juvenis se enterrarem. Idealmente, os juvenis devem ser mantidos em substrato com 1-2 mm, que permite uma passagem eficiente da água pelos interstícios e, consequentemente, melhor fornecimento de oxigénio e alimento para os juvenis enterrados (Lavictoire *et al.*, 2015).

Durante o período das 0-10 semanas de vida, os indivíduos criados em sistema aberto cresceram significativamente mais do que os de sistema fechado, apresentando um incremento no comprimento máximo de concha três vezes superior. É possível que a diferença de tamanhos seja ainda maior, uma vez que no último momento de avaliação dos juvenis de sistema aberto foram medidos apenas os indivíduos de menores dimensões (ver secção 2.3.4), o que enfatiza o melhor desempenho do sistema aberto no desenvolvimento de juvenis saudáveis.

Apesar de terem sido mantidos em condições semelhantes, a taxa de sobrevivência dos juvenis criados em sistema fechado variou muito entre recipientes e ensaios. Este fenómeno é bastante comum durante a criação de mexilhões juvenis em cativeiro (J. Reis, comunicação pessoal, 2020), sendo que, no primeiro mês, a mortalidade elevada está principalmente associada com o processo de maturação dos juvenis e, mais tarde, com as condições do meio de cultura (Jones, Mair & Neves, 2005). Neste estudo em particular, as taxas de sobrevivência e crescimento dos juvenis mantidos em sistema fechado foram bastante baixas em relação a outras experiências semelhantes (Eybe *et al.*, 2013; Scheder *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2018), mas equiparáveis aos resultados obtidos no projeto LIFE ECOTONE (Quercus ANCN, 2015). No entanto, por volta das 6 semanas de vida, a dimensão média dos juvenis estabilizou, nunca ultrapassando os 600 µm, consequência da morte de juvenis de maior dimensão ou da interrupção do seu crescimento (Anexos, **Figura 7.2**). Este padrão foi observado nos diferentes ensaios, o que sugere que as condições em que os juvenis foram criados podem não ter cumprido os requisitos necessários ao desenvolvimento da espécie.

Os principais fatores relacionados com a sobrevivência e crescimento dos juvenis de mexilhão-de-rio são (1) a quantidade e qualidade do alimento, (2) o substrato, (3) a temperatura, (4) a presença de predadores ou competidores e (5) a qualidade da água (Buddensiek, 1995; Jones, Mair & Neves, 2005; Lange & Selheim, 2011). A dieta e o substrato não deverão ser responsáveis pela estabilização do comprimento médio dos juvenis criados em sistema fechado, uma vez que as condições proporcionadas foram semelhantes entre esta experiência e a desenvolvida no LIFE ECOTONE, onde o crescimento foi contínuo (Quercus ANCN, 2015). Durante a manutenção dos juvenis mantidos em sistema fechado foram identificados e removidos alguns potenciais predadores e competidores, nomeadamente macroinvertebrados aquáticos, tais como: insetos (fase larvar de indivíduos das ordens Trichoptera e Diptera), anélideos (classe Oligochaeta) e crustáceos (subclasse Copepoda). Para além disso, também foram detetados rotíferos (filo Rotifera), que se alimentam de bactérias e algas que se acumulam no meio de cultivo, e uma “espécie de praga” – *Carchesium* spp. – que forma colónias na concha dos mexilhões juvenis (Kern *et al.*, 2018). Ainda assim, não se considera que a abundância destes organismos tenha sido suficiente para impactar a sobrevivência dos juvenis mantidos em sistema fechado, ainda para mais tendo em conta frequência da limpeza e renovação da água dos recipientes.

No meio natural, o recrutamento de juvenis de *M. margaritifera* é negativamente afetado pelo aumento do pH, do BOD (*biochemical oxygen demand*, que corresponde à quantidade de oxigénio consumido na degradação da matéria orgânica), da condutividade e da concentração de cálcio e fosfato, sendo que todos estes parâmetros estão correlacionados com os níveis de produtividade aquática e, consequentemente, também de eutrofização (Bauer, 1988; Bauer, 1992). Apesar de não terem sido feitas análises químicas à água de Castrelos, é pouco provável que a sua hidroquímica seja responsável pela estabilização do comprimento médio dos juvenis criados em sistema fechado, uma vez que não foram observadas anomalias no desenvolvimento dos juvenis em sistema aberto e ambos os sistemas foram alimentados com água do mesmo rio. A única diferença aparente entre sistemas seria nos níveis de oxigenação, no entanto, experiências prévias já demonstraram que a renovação semanal da água dos recipientes é suficiente para manter os juvenis de *M. margaritifera* em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Eybe *et al.*, 2013; Scheder *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2018).

A temperatura tem um efeito positivo forte no crescimento dos indivíduos de *M. margaritifera* (Bauer, 1992; Hastie, Young & Boon, 2000). No presente estudo, a câmara térmica onde foram colocados os recipientes com juvenis foi mantida a uma temperatura entre 14-18°C, aumentando ao longo do período de cativeiro. Embora a temperatura mínima registada tenha sido inferior à observada em Campelo, no projeto LIFE ECOTONE (Quercus ANCN, 2015), esta foi uma ocorrência pontual assinalada apenas no início do período de cativeiro, durante o qual houve crescimento dos juvenis. Em sistema aberto, os juvenis estiveram expostos a uma maior variação da temperatura, entre 12-21°C.

Tendo em conta que a temperatura da câmara térmica foi mais baixa e não acompanhou a evolução da mesma em meio natural, é possível que este desajuste tenha contribuído para a estabilização do comprimento médio dos juvenis mantidos em recipientes. Em experiências futuras, é essencial que ambos os sistemas sejam mantidos a temperaturas semelhantes ao longo de todo o período de estudo, de forma a individualizar os efeitos isolados da temperatura e do tipo de sistema no desenvolvimento dos juvenis.

Durante a recolha de juvenis nos tanques cónicos, observou-se uma tendência para os juvenis libertados serem gradualmente maiores, confirmando a existência de uma relação positiva entre a duração da fase parasítica e a dimensão à nascença, já observada por Marwaha *et al.* (2017). No entanto, ao contrário do esperado, a duração da fase parasítica não influenciou as taxas de sobrevivência e crescimento dos juvenis. Uma vez que não se obteve o número total de juvenis inicialmente previsto, o tamanho da amostra e a duração do período de libertação provavelmente não foram suficientes para detetar o efeito previsto, pelo que este resultado carece de confirmação.

A dimensão inicial dos juvenis de *M. margaritifera*, independentemente do momento em que nasceram, variou entre 207 e 471 μm , sendo que este parâmetro não influenciou a taxa de sobrevivência dos mexilhões. Apesar de indivíduos de menor dimensão à nascença apresentarem maior taxa de crescimento, os juvenis com comprimento inicial entre 400-450 μm atingiram uma dimensão significativamente superior ($466,42 \pm 38,18 \mu\text{m}$) à dos juvenis com comprimento inicial entre 200-250 μm ($402,33 \pm 12,86$).

O número de juvenis mantidos por recipiente variou, nunca ultrapassando os 200 indivíduos por 100 mL. A utilização de poucos indivíduos por recipiente reduz o impacto de um possível evento geral de infeção fúngica nos juvenis da mesma caixa e, apesar de não afetar a taxa de sobrevivência, Eybe *et al.* (2013) mostraram que a taxa de crescimento é significativamente superior para juvenis mantidos em caixas com menos indivíduos. Os mesmos autores determinaram que a densidade ótima de mexilhões por caixa é de 200 indivíduos por 500 mL de água.

Em conclusão, o crescimento superior observado para os juvenis criados em sistema aberto, associado à facilidade de manutenção, faz desta técnica a mais eficiente para a criação de um grande número de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro. De facto, esta técnica é significativamente menos trabalhosa que a criação de juvenis de *M. margaritifera* em sistema fechado, no sentido em que os indivíduos não necessitam de manutenção frequente. A criação de juvenis pós-parasíticos em recipientes plásticos permite um maior controlo da sua sobrevivência e crescimento, no entanto, os juvenis ficam limitados às condições artificiais proporcionadas, que poderão condicionar o seu desenvolvimento, devido a carências nutricionais ou de outro tipo. A utilização ambos os tipos de sistemas representa um compromisso a longo prazo para com o projeto, uma vez que são necessários vários anos desde a infeção de hospedeiros até à obtenção de juvenis com elevada probabilidade de sucesso em programas de reintrodução ou reforço populacional (Thomas, Taylor & de Leaniz, 2010).

4.1.1 Otimização do regime alimentar

Por ser um sistema artificial, a criação de juvenis de *M. margaritifera* em sistema fechado requer cuidados mais frequentes e minuciosos que os restantes sistemas, sendo necessário otimizar e manter condições favoráveis ao desenvolvimento dos juvenis, nomeadamente no que diz respeito aos seus requisitos nutricionais. As algas são uma importante fonte de alimento para os juvenis de *M. margaritifera* e são, normalmente, a principal componente da dieta de indivíduos criados em cativeiro (Hua, Neves & Jiao, 2013). O facto de os juvenis alimentados com algas do género *Scenedesmus* apresentarem elevada taxa de mortalidade e crescimento irrisório decorre, provavelmente, do facto desta dieta não cumprir os requisitos nutricionais de *M. margaritifera*, que são, na verdade, maioritariamente desconhecidos. Por esta razão, deve-se utilizar uma mistura de diferentes espécies de algas, de forma a

maximizar a probabilidade de fornecer o alimento ideal aos mexilhões, não só no que diz respeito à composição nutricional das algas, mas também ao seu tamanho (Eybe *et al.*, 2013; Hua, Neves & Jiao, 2013). Neste trabalho concluiu-se que a dieta Shellfish Diet 1800 + Nanno 3600 suplementada com detritos produz juvenis de *M. margaritifera* com maior taxa de sobrevivência e crescimento, em relação a dietas compostas apenas por algas. Este resultado é suportado pela experiência de Eybe *et al.* (2013), que depois de testarem diferentes combinações de algas, detritos – mistura de matéria orgânica com microrganismos (algas, bactérias, fungos) e algum sedimento – e proteína animal, obtiveram melhores resultados para os juvenis alimentados com uma combinação de algas e detritos. Os mesmos autores concluíram que o crescimento dos mexilhões está diretamente relacionado com a concentração de algas e sugerem que a melhor estratégia é fornecer uma concentração mais elevada de algas após o primeiro mês de vida. Araujo *et al.* (2018) criou juvenis de *M. margaritifera* em recipientes plásticos, alimentados com uma mistura de algas e detritos, sendo que a concentração de algas foi duplicada após o primeiro mês e triplicada ao fim de 6 meses. Ao fim de 2 meses os juvenis atingiram um comprimento médio de 780 µm, uma dimensão bastante superior à obtida neste estudo.

Os detritos funcionam não só como fonte de alimento, mas também como um composto biológico ativo, uma vez que funcionam como substrato para bactérias nitrificantes, que reduzem os níveis de substâncias nocivas acumuladas nos recipientes, tais como o amoníaco e nitrito, prejudiciais ao desenvolvimento dos juvenis (Skinner, Young & Hastie, 2003; Eybe *et al.*, 2013). Em Portugal, este regime alimentar não é adotado com frequência, devido à limitação da disponibilidade de lameiros, onde são recolhidos os detritos, quando comparado com outras regiões onde *M. margaritifera* ocorre (Aguiar *et al.*, 2018). Face a este constrangimento, seria vantajoso criar uma solução para a conservação de detritos, de forma a que pudessem ser utilizados a longo prazo na alimentação dos juvenis.

4.2 Desempenho do sistema semi-natural

Devido à elevada taxa de mortalidade dos juvenis de *M. margaritifera* introduzidos no rio em sistemas de retenção, não foi possível avaliar de forma conclusiva as taxas de sobrevivência e crescimento dos juvenis criados em sistema aberto e fechado.

O facto de os juvenis de *M. margaritifera* terem sido introduzidos numa população diferente da qual são originários poderá ter tido algum impacto na sua *fitness*, no entanto, é preciso ter em conta que existem vários casos bem-sucedidos de translocação de indivíduos de mexilhão-de-rio entre rios distintos (exemplos referenciados em Pires *et al.*, 2020).

A experiência *in-situ* foi conduzida em três locais do rio Beça, sendo que os melhores resultados em termos de sobrevivência foram obtidos para os juvenis introduzidos no local 2 (troço central), que apresenta características particularmente distintas dos restantes e favoráveis ao desenvolvimento de juvenis de *M. margaritifera*. A elevada granulometria registada neste local deriva da abundância de rochas que, associadas a alguma areia, funcionam como refúgios ideais para os juvenis se enterrarem (Hastie, Boon & Young, 2000). Para além disso, o potencial *redox* no substrato é mais elevado do que nos restantes locais e existe, também, uma menor diferença de potencial *redox* entre a coluna de água e o substrato. Esta situação reflete a existência de conectividade entre a água corrente e o meio intersticial, condição ideal à subsistência dos mexilhões juvenis (Geist & Auerswald, 2007). Os resultados obtidos para os diferentes locais são consistentes com a caracterização dos três núcleos populacionais de *M. margaritifera* do rio Beça, em que a maior densidade, melhor sobrevivência e recrutamento ocorrem no troço central do rio (Garrido-López, 2018).

A mortalidade total dos juvenis registada nos locais 1 (jusante) e 3 (montante) poderá estar associada à ocorrência de valores de potencial *redox* bastante abaixo do limite mínimo tolerado por *M. margaritifera* (Schlesinger, 1991). Esta redução pode ter resultado, por exemplo, do aumento da temperatura da água, da acumulação de sedimentos finos e/ou da redução do fluxo de água (Geist &

Auerswald, 2007). Este resultado vai ao encontro dos obtidos noutros estudos, que identificam o potencial *redox* como uma das condicionantes mais importantes do recrutamento em populações de *M. margaritifera* (Denic & Geist, 2015; Gosselin, 2015). A ocorrência de recrutamento heterogéneo entre locais na área de distribuição da mesma população de *M. margaritifera* não é inesperado, no sentido em que já existem evidências da adaptação da espécie à variação das condições ambientais. Uma vez que habitam ambientes oligotróficos, pobres em nutrientes, os indivíduos desta espécie são obrigados a alocar recursos entre o crescimento e a reprodução, de forma a garantir a sua subsistência. Frequentemente, o sucesso do recrutamento de juvenis de *M. margaritifera* varia não só entre locais, como também entre anos favoráveis e desfavoráveis (Bauer, 1998).

Após 6 semanas de exposição às condições naturais, todos os juvenis instalados no local 2 foram encontrados mortos, provavelmente devido a perturbações ocorridas na região. Durante a quarta semana de experiência, foram registadas atividades de extração madeireira na galeria ripícola próxima do local de estudo. Duas semanas depois, verificou-se que os acessos ao rio estavam obstruídos por árvores e vegetação caídas e que, já dentro do próprio rio, existiam ramos e marcas de arrastamento de sedimento. Nesta altura, observou-se uma redução significativa do potencial *redox* no local 2, indicativa da limitação da disponibilidade de oxigénio na zona hiporeica. A colmatação dos interstícios do substrato leva, habitualmente, ao desenvolvimento de condições anóxicas (< 300 mV; Schlesinger, 1991), intoleráveis para os juvenis de *M. margaritifera*. Alterações no uso do solo das margens ribeirinhas, tais como a remoção de árvores e outras práticas agrícolas e silvícolas, podem ter impactos negativos na sobrevivência dos mexilhões-de-rio, devido ao aumento da carga de sedimentos no rio (Watters, 2000; Österling, Arvidsson & Greenberg, 2010; Denic & Geist, 2015; Popov, 2015). A quantidade excessiva de sedimentos finos limita as trocas entre a água corrente e a zona hiporeica do substrato, resultando na redução do fornecimento de oxigénio e alimento ao meio intersticial e consequente morte dos juvenis (Santos *et al.*, 2015; Scheder *et al.*, 2015; Lummer, Auerswald & Geist, 2016).

Em geral, a taxa de sobrevivência dos juvenis introduzidos no rio foi extremamente baixa, não tendo sido detetadas diferenças significativas entre indivíduos provenientes de sistema aberto e sistema fechado. Pensa-se que este resultado tenha sido influenciado pelo facto de (1) a amostra analisada ser muito reduzida, (2) a variabilidade entre tubos do mesmo sistema ser muito elevada e (3) ambos os tratamentos apresentarem 3 tubos com 0 indivíduos sobreviventes. Não se considera que este resultado reflita insuficiências na identificação de sobreviventes, uma vez que a taxa de detetabilidade de juvenis nos tubos foi extremamente elevada. De facto, o uso de sedimento com 1-2 mm facilitou a procura de indivíduos à lupa, dada a diferença de dimensão entre ambos. Juvenis não detetados pertenciam, normalmente, a tubos cuja manutenção só foi feita várias semanas depois do início da experiência. Caso os indivíduos já estejam mortos, a probabilidade de identificar a sua concha reduz consideravelmente, uma vez que esta se desintegra rapidamente, podendo, até, desaparecer ao fim de poucos dias.

Dada a dificuldade de detetar juvenis pós-parasíticos em rio, existem poucos registos acerca da sua taxa de sobrevivência e crescimento em condições naturais. De acordo com a bibliografia disponível, apenas 5% dos juvenis de *M. margaritifera* recém-metamorfizados conseguem estabelecer-se no meio intersticial e atingir a idade adulta (Buddensiek, 1995; Hastie & Young, 2003a; Schmidt & Vandr , 2010). Apesar de a utilização de sistemas de retenção facilitar a determinação das taxas de crescimento e sobrevivência em rio, ainda existem poucos dados disponíveis para os primeiros meses após a libertação dos juvenis. Ainda assim, em comparação com estudos semelhantes, a taxa de sobrevivência obtida foi extremamente baixa (**Tabela 4.1**).

Os juvenis provenientes de sistema aberto tinham, no início da experiência, um comprimento médio de $508,45 (\pm 40,50)$ μm e os juvenis de sistema fechado $466,45 (\pm 40,65)$ μm , sendo que não foi detetado crescimento em qualquer um dos grupos ao fim de 4 semanas. A elevada taxa de mortalidade dos juvenis não permite conclusões sólidas acerca da capacidade de juvenis criados em cativeiro se

adaptarem ao meio natural. Outros estudos com utilização de sistemas de retenção para reintrodução de juvenis de *M. margaritifera* evidenciam uma elevada variação das taxas de sobrevivência e crescimento, mas sugerem que mexilhões juvenis de maior dimensão apresentam a maior sobrevivência após reintrodução. De acordo com Lange e Selheim (2011), um comprimento total de cerca de 1 mm pode ser considerado o tamanho mínimo necessário para a sobrevivência durante o primeiro inverno. Também Buddensiek (1995) concluiu que a sobrevivência dos juvenis depende maioritariamente da sua dimensão antes do primeiro inverno, sendo que todos os indivíduos com menos de 700 µm aos três meses de idade morreram ao fim de mais 7 meses de exposição.

A informação existente indica que a opção mais vantajosa será criar os juvenis em cativeiro até que estes atinjam, no mínimo, um comprimento de concha de 1 mm e, só depois, reintroduzi-los no rio. Este “método misto” permite criar os mexilhões em condições controladas durante a fase mais crítica do seu desenvolvimento, aumentando a probabilidade de estes sobreviverem em meio natural e atingirem a idade adulta.

Tabela 4.1 - Diferentes sistemas de retenção utilizados para a reintrodução de juvenis de *M. margaritifera* e respetivas taxas de sobrevivência.

| Método | Descrição | Sobrevivência | Referência |
|---|---|---|------------------------------|
| Placa de Buddensiek (ou <i>sheet cage</i>) | Colocação de indivíduos recém-metamorfozados em rio, utilizando um sistema de retenção criado pelo próprio. | < 50% nos primeiros 4 meses de experiência; Ainda existiam sobreviventes ao fim de 52 meses de exposição. | Buddensiek, 1995 |
| Placa de Buddensiek modificada | Colocação de indivíduos recém-metamorfozados em rio. | 11% após 7 meses de exposição às condições naturais e 3% ao fim de 1 ano. | Hastie & Young, 2003a |
| Placa de Buddensiek, caixas de sedimento e bolsas de gaze | Colocação de juvenis recém-metamorfozados em diferentes tipos de sistemas de retenção em rio. | 0-29% nos primeiros 5 meses. | Schmidt & Vandr , 2010 |
| Placa de Buddensiek modificada | Reintrodução de juvenis com mais de 1 mm, criados em cativeiro (em recipientes plásticos sem circulação de água). | 90% ao fim de 7 meses. | Scheder <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Mussel silos</i> | Reintrodução de juvenis com 4-20 mm, criados em cativeiro. | 61-97% ao fim de 18 meses. | Kyle <i>et al.</i> , 2016 |
| Placa de Buddensiek | Reintrodução de juvenis com mais de 1 mm, criados em cativeiro. | 40-93% ao fim de 1 ano. | Denic, 2018 |

4.2.1 33Efeito do sistema de retenção no crescimento

Em *raceway*, os juvenis criados no substrato apresentaram um comprimento de concha significativamente maior do que os indivíduos criados em tubos. Para além disso, o crescimento dos juvenis mantidos em tubos, provenientes quer de sistema aberto, quer de sistema fechado, foi residual. Este resultado sugere que os tubos podem condicionar o crescimento dos juvenis, possivelmente devido ao facto de (1) o espaço disponível ser limitado e/ou (2) a circulação de água e nutrientes não ser eficaz.

Este resultado é consistente com o observado por outros autores para outros sistemas de retenção em meio natural. Um dos sistemas mais utilizado para a criação de juvenis de mexilhão-de-rio em condições semi-naturais é a placa de Buddensiek (ou *sheet cage*), que consiste em placas acrílicas perfuradas e forradas com rede micrométrica, onde em cada orifício são colocados indivíduos pós-parasíticos (Buddensiek, 1991). O autor comparou o crescimento de juvenis de *M. margaritifera* mantidos em *sheet cages* no rio durante 2 anos, com mexilhões jovens recolhidos na natureza e observou

que os animais mantidos nos sistemas de retenção apresentavam menor taxa de crescimento. Schmidt & Vandr  (2010), ao compararem diferentes sistemas de retenção para a criação de juvenis de *M. margaritifera*, concluíram que o crescimento é maior em animais criados em estruturas de retenção mais espaçosas. Por fim, Hanlon (2000) revelou que o crescimento de juvenis de *Lampsilis fasciola* (família Unionidae) criados em liberdade é superior ao de juvenis criados dentro de recipientes colocados na mesma *raceway*. No caso de o crescimento estar a ser limitado pelo fornecimento insuficiente de água e nutrientes, a utilização de juvenis com maior comprimento de concha poderia permitir a sua introdução no rio em sistemas de retenção com uma rede de malha maior, favorecendo, assim, uma melhor circulação de água e alimento dentro dos tubos (J. Reis, comunicação pessoal, 2020). Para além disso, a forma como o sistema de retenção é colocado no rio poderá, t mbe m, ser impactante no desenvolvimento dos juvenis. Schmidt & Vandr  (2010) não detetaram diferenças na taxa de sobrevivência e crescimento de juvenis criados em placas de Buddensiek expostas à corrente no fundo do rio e enterradas no sedimento, no entanto, dada a irregularidade das taxas de sucesso obtidas para os vários sistemas de retenção, os resultados poderão ser diferentes para outros tipos de sistemas.

Os *mussel silos* são pequenas versões de um sistema aberto, com circulação de água, utilizados para criar juvenis de mexilhão-de-rio em laboratório, mas que podem ser implantados em meio natural (Barnhart *et al.*, 2007). Este sistema de retenção tem vindo a ser adaptado e foi já utilizado em diversas experiências, tendo obtido, em comparação com outros sistemas, melhores resultados em termos de sobrevivência e crescimento dos juvenis, mostrando-se uma técnica promissora (Haag & Williams, 2014; Kyle *et al.*, 2016; Haag *et al.*, 2019).

Apesar das possíveis limitações, a utilização de sistemas de retenção é vantajosa, no sentido em que permite introduzir os juvenis diretamente em habitat adequado, monitorizar a sobrevivência e crescimento dos juvenis e avaliar diretamente o sucesso das medidas de conservação aplicadas (Buddensiek, 1995). Para além disso, a criação de juvenis em meio semi-natural permite recolher dados acerca dos fatores que determinam a qualidade do habitat dos mexilhões-de-rio. Esse conhecimento t mbe m irá contribuir para o sucesso dos programas de recuperação da espécie, que dependem da identificação dos locais adequados para a libertação dos mexilhões criados (Gum, Lange & Geist, 2011).

  de referir que, devido à mortalidade inesperada de todos os mexilhões juvenis às seis semanas da experiência *in-situ*, não foi tido em conta o potencial efeito da manipulação dos indivíduos mantidos nos tubos. Lavictoire (2016) alerta para o facto de vários autores apresentarem resultados contraditórios relativamente aos efeitos da manipulação dos juvenis criados em cativeiro. Apesar de a maioria das espécies de mexilhão-de-rio beneficiar de alguma manutenção, nomeadamente no que diz respeito   remoção de partículas finas, potenciais predadores e fungos (Jones, Mair & Neves, 2005; Eybe *et al.*, 2013), vários estudos revelaram que as taxas de sobrevivência e crescimento diminuem com o aumento da frequência da manutenção, devido ao *stress* provocado pela perturbação ou a danos e perdas acidentais (O'Beirn, Neves & Steg, 1998; Zimmerman, 2003; Barnhart, 2006; Liberty *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÃO

A criação de juvenis de *M. margaritifera* em cativeiro é uma estratégia cada vez mais comum na conservação da espécie, tendo como objetivo a produção de mexilhões em número suficiente para que possam ser utilizados para reforçar populações reduzidas. Atualmente, existem vários métodos eficazes para atingir este objetivo geral, sendo que a escolha do método a utilizar está muito dependente das condições locais, tais como o acesso a instalações adequadas, a qualidade do habitat disponível e os recursos humanos e financeiros disponíveis.

A criação de indivíduos em recipientes plásticos é um método extremamente laborioso, que requer frequente manutenção e monitorização. Apesar de permitir um maior controlo das taxas de sobrevivência e crescimento dos juvenis, este sistema é completamente artificial e dificulta a satisfação dos requisitos da espécie. Por outro lado, criar os juvenis no substrato em *raceway* mostrou-se muito simples e rentável, permitindo a criação de juvenis saudáveis em grande escala e em condições que se assemelham às naturais.

A experiência atual e outras semelhantes indicam que a opção mais vantajosa será criar os juvenis em cativeiro até que estes atinjam um comprimento mínimo de 1 mm e, só depois, reintroduzi-los no rio. Este “método misto” permite criar os mexilhões em condições controladas durante a fase mais crítica do seu desenvolvimento, aumentando a probabilidade de sobreviverem em meio natural e atingirem a idade adulta. Apesar de ser necessário esclarecer o seu impacto no desenvolvimento dos mexilhões, a utilização de sistemas de retenção durante a sua introdução no rio é vantajosa, no sentido em que permite monitorizar a sobrevivência e crescimento dos juvenis e avaliar o sucesso das medidas de conservação aplicadas.

É essencial que este tipo de programas seja executado em articulação com medidas de recuperação do habitat da espécie, uma vez que, tal como evidenciado, os juvenis são extremamente sensíveis às condições do meio. A mortalidade dos juvenis introduzidos no rio foi extremamente elevada, consequência de perturbações ambientais nos diferentes locais de estudo, nomeadamente no que diz respeito às condições de oxigenação do meio intersticial. Perturbações no meio, de origem natural e humana, poderão ter levado à colmatação dos interstícios onde estão enterrados os juvenis e, consequentemente, ao desenvolvimento de condições anóxicas, intoleráveis para os juvenis de *M. margaritifera*.

No futuro, durante o programa de reprodução atualmente em curso, será adotada a estratégia inicialmente planeada, com obtenção de todos os juvenis nos tanques cónicos e posterior criação nos sistemas fechado e aberto, o que permitirá realizar mais testes e esclarecer questões em aberto. Para o sistema fechado, seria vantajoso testar (1) diferentes dietas, com incorporação de detritos e aumento da concentração de algas em fases de vida mais avançadas, e (2) a influência da adição de substrato nos recipientes no crescimento e sobrevivência dos juvenis. No sistema aberto será utilizada areia com a granulometria indicada e seria, também, importante criar um desenho experimental com amostragens periódicas e a utilização de um sistema de amostragem, por exemplo, com quadrículas ao longo dos tanques, de forma a criar unidades individualizadas de juvenis em todo o substrato. Por fim, previamente à reintrodução dos juvenis cativos, deverá ser investigado o efeito dos tubos no seu crescimento e, caso necessário, repensar o sistema de retenção em si e a forma como é colocado no rio.

Através da otimização e padronização das técnicas de criação em cativeiro, espera-se vir a conseguir contrariar a tendência de envelhecimento das populações portuguesas de *M. margaritifera*.

6. REFERÊNCIAS

- Araujo, R., Campos, M., Feo, C., Varela, C., Soler, J. & Ondina, P. (2018). Who wins in the weaning process? Juvenile feeding morphology of two freshwater mussel species. *Journal of Morphology*, 279, 4-16. <https://doi.org/10.1002/jmor.20748>
- Aguiar, C., Castro, J.P., Bastos, P. & Monteiro-Henriques, T. (2018). *SOS Lameiros – Diagnóstico da situação dos prados de feno no território SUDOE*. Interreg SUDOE.
- Barnhart, M. (2006). Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture*, 254, 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.028>
- Barnhart, M.C., Fobian, T.B., Whites, D.W. & Ingersoll, C.G. (2007). *Mussel Silos: Bernoulli Flow Devices for Caging Juvenile Mussels in Rivers*. Proceedings of the 5th Biennial Symposium of the Freshwater Mollusk Conservation Society, Little Rock, Arkansas.
- Bauer, G. (1987). Reproductive Strategy of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. *The Journal of Animal Ecology*, 56, 691. <https://doi.org/10.2307/5077>
- Bauer, G. (1988). Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in central Europe. *Biological Conservation*, 45, 239-253. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(88\)90056-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(88)90056-0)
- Bauer, G. (1991). Plasticity in Life History Traits of the Freshwater Pearl Mussel — Consequences for the Danger of Extinction and for Conservation Measures. *Species Conservation: A Population-Biological Approach*, 103–120. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6426-8_8
- Bauer, G. (1992). Variation in the Life Span and Size of the Freshwater Pearl Mussel. *The Journal of Animal Ecology*, 61, 425-436. <https://doi.org/10.2307/5333>
- Bauer, G. (1998). Allocation policy of female freshwater pearl mussels. *Oecologia* 117, 90–94. <https://doi.org/10.1007/s004420050635>
- Bevenger, G.S. & King, R.M. (1995). *A pebble count procedure for assessing watershed cumulative effects*. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station.
- Bílý, M., Simon, O., Barák, V. & Jahelková, V. (2020). Occurrence depth of juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in a river bed tested by experimental mesh tubes. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04298-8>
- Buddensiek, V. (1991). Untersuchungen zu den aufwuchsbedingungen der flubperlmuschel *Margaritifera margaritifera* L. in ihrer frühen postparasitären phase. Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Deutschland.
- Buddensiek, V. (1995). The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: A contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. *Biological Conservation*, 74, 33–40. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00012-S](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00012-S)
- Catita, D., Gama, M., Azedo, R., Banha, F., Pinto, J., Ilhéu, A. et al. (2020). Detection and possible elimination of the first recorded population of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Portugal from a reservoir. *Management of Biological Invasions*, 11, 406-414. <https://doi.org/10.3391/mbi.2020.11.3.04>

- Cummings, K.S. & Graf, D.L. (2009). Mollusca: Bivalvia. In: J.H. Thorp, A.P. Covich (Eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition)*. Academic Press, pp. 309–384. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02669-5>
- Denic, M. (2018). Comparison of two different field cages for semi-natural rearing of juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Unionoidea: Margaritiferidae). *Folia Malacologica*, 26, 189-195. <https://doi.org/10.12657/folmal.026.018>
- Denic, M. & Geist, J. (2015). Linking stream sediment deposition and aquatic habitat quality in pearl mussel streams: implications for conservation. *River Research and Applications*, 31, 943-952. <https://doi.org/10.1002/rra.2794>
- Eybe, T., Thielen, K., Bohn, T. & Sures, B. (2013). The first millimetre – rearing juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.) in plastic boxes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23, 964-975. <https://doi.org/10.1002/aqc.2384>
- Feio, M.J. & Ferreira, V. (2019). *Rios de Portugal: comunidades, processos e alterações*. Coimbra, Portugal: Imprensa da Universidade de Coimbra. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-1624-7>
- Ferreira-Rodríguez, N., Sousa, R. & Pardo, I. (2018). Negative effects of *Corbicula fluminea* over native freshwater mussels. *Hydrobiologia*, 810, 85–95. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3059-1>
- Garrido-López, D.G. (2018). *Dinámica poblacional de Margaritifera margaritifera en la Cuenca del Duero*. Trabajo de fin de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Geist, J. & Auerswald, K. (2007). Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology*, 52, 2299-2316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01812.x>
- Geist, J. (2010). Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia*, 644, 69-88. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0190-2>
- Gosselin, M-P. (2015). Conservation of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the river Rede, UK: Identification of instream indicators for catchment-scale issues. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*, 50, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.12.004>
- Gum, B., Lange, M. & Geist, J. (2011). A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21, 743-751. <https://doi.org/10.1002/aqc.1222>
- Haag, W.R., Culp, J.J., McGregor, M.A., Bringolf, R. & Stoeckel, J.A. (2019). Growth and survival of juvenile freshwater mussels in streams: Implications for understanding enigmatic mussel declines. *Freshwater Science*, 38, 753-770. <https://doi.org/10.1086/705919>
- Haag, W.R. & Williams, J.D. (2014). Biodiversity on the brink: an assessment of conservation strategies for North American freshwater mussels. *Hydrobiologia*, 735, 45-60. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1524-7>
- Hanlon, S.D. (2000). *Release of juvenile mussels into a fish hatchery raceway: a comparison of techniques*. MSc thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA.

- Hastie, L.C., Boon, P.J. & Young, M.R. (2000). Physical microhabitat requirements of freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Hydrobiologia*, 429, 59-71. <https://doi.org/10.1023/A:1004068412666>
- Hastie, L.C. & Young, M.R. (2001). Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidiosis in wild and farmed salmonid stocks in Scotland. *Hydrobiologia*, 445, 109-119. <https://doi.org/10.1023/A:1017588222480>
- Hastie, L.C. & Young, M.R. (2003a). *Conservation of the freshwater pearl mussel I. Captive breeding techniques*. Conserving Natura 2000 Rivers Conservation Techniques Series No. 2. English Nature, Peterborough.
- Hastie, L.C. & Young, M.R. (2003b). *Conservation of the Freshwater Pearl Mussel 2. Relationship with Salmonids*. Conserving Natura 2000 Rivers Conservation Techniques Series No.3. English Nature, Peterborough.
- Hastie, L.C. & Young, M.R. (2003c). Timing of spawning and glochidial release in Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Freshwater biology*, 48, 2107-2117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01153.x>
- Hastie, L.C., Young, M.R. & Boon, P.J. (2000). Growth characteristics of freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Freshwater Biology*, 43, 243-256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00544.x>
- Hersch, R.W. (2009). *Streamflow measurement*, 3rd London: Routledge.
- Holyoak, D.T., Holyoak, G.A. & Mendes, R.M.C. (2019). A revised check-list of the land and freshwater Mollusca (Gastropoda and Bivalvia) of mainland Portugal. *Iberus*, 37, 113-168.
- Hruška, J. (1992). The freshwater pearl mussel in South Bohemia: evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. *Archiv fuer Hydrobiologie*. 126, 181-191.
- Hruška, J. (1999). Nahrungsansprüche der Flussperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der Tschechischen Republik. *Heldia*, 4, 69-79.
- Hua, D., Neves, R.J. & Jiao, Y. (2013). Effects of algal density, water flow and substrate type on culturing juveniles of the rainbow mussel (*Villosa iris*) (Bivalvia: Unionidae) in a laboratory recirculating system. *Aquaculture*, 416-417, 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.002>
- IUCN European Red List. (2019). *Infographic on the most endangered species in Europe*. Available at: <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20200519STO79424/endangered-species-in-europe-facts-and-figures-infographic>
- Jones, J., Mair, R. & Neves, R. (2005). Factors Affecting Survival and Growth of Juvenile Freshwater Mussels Cultured in Recirculating Aquaculture Systems. *North American Journal of Aquaculture*, 67, 210-220. <https://doi.org/10.1577/A04-055.1>
- Kern, M., Lavictoire, L., Bradley, M., Eckert, N., Glidewell, B. & Barnhart, C. (2018). *Pests predators, parasites, and related problems in the culture of freshwater mussels* [Poster]. Freshwater Mollusk Conservation Society – Mollusk Health and Disease Workshop, Wisconsin, USA.

- Kyle, R., Reid, N., O'Connor, N. & Roberts, D. (2016). Development of release methods for captive-bred freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27, 492–501. <https://doi.org/10.1002/aqc.2704>
- Lange, M. & Selheim, H. (2011). Growing factors of juvenile freshwater pearl mussels and their characteristics in selected pearl mussel habitats in Saxony (Germany). In: F. Thielen (Eds.) *Ferrantia*, 64. Luxembourg: Musée national d'histoire naturelle, pp. 30-37.
- Lavictoire, L. (2016). *Juvenile biology and captive rearing of the freshwater pearl mussel Margaritifera margaritifera*. Doctoral dissertation, Lancaster University, United Kingdom.
- Lavictoire, L., Moorkens, E., Ramsey, A.D., Sinclair, W. & Sweeting, R.A. (2015). Effects of substrate size and cleaning regime on growth and survival of captive-bred juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia*, 766, 89–102. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2445-4>
- Liberty, A.J., Ostby, B.J. & Neves, R.J. (2007). Determining a suitable substrate size and sampling frequency for rearing juvenile rainbow mussels *Villosa iris*. *North American Journal of Aquaculture*, 69, 44-52. <https://doi.org/10.1577/A05-090.1>
- Lopes-Lima, M., Teixeira, A., Froufe, E., Lopes, A., Varandas, S. & Sousa, R. (2014). Biology and conservation of freshwater bivalves: past, present and future perspectives. *Hydrobiologia*, 735, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1902-9>
- Lummer, E.-M., Auerswald, K., Geist, J. (2016). Fine sediment as environmental stressor affecting freshwater mussel behavior and ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 571, 1340-1348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.027>
- Marwaha, J., Jensen, K.H., Jakobsen, P.J. & Geist, J. (2017). Duration of the parasitic phase determines subsequent performance in juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*). *Ecology and Evolution*, 7, 1375-1383. <https://doi.org/10.1002/ece3.2740>
- Morelet, A. (1845). *Description des mollusques terrestres et fluviatiles du Portugal*. Paris: Bailliere. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.12994>
- Moorkens, E. 2011. *Margaritifera margaritifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T12799A3382660.
- Nobre, A. (1941). *Fauna Malacológica de Portugal II. Moluscos terrestres e fluviais*. Coimbra, Portugal: Memórias e Estudos do Museu da Universidade de Coimbra.
- O'Beirn, F.X., Neves, R.J. & Steg, M.B. (1998). Survival and growth of juvenile freshwater mussels (Unionidae) in a recirculating aquaculture system. *American Malacological Bulletin*, 14(2), 165-171.
- Österling, M., Arvidsson, B.L. & Greenberg, L.A. (2010). Habitat degradation and the decline of the threatened mussel *Margaritifera margaritifera*: influence of turbidity and sedimentation on the mussel and its host. *Journal of Applied Ecology*, 47, 759–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01827.x>

- Pires, D.F., Reis, J., Benites, L. & Rodrigues, P. (2020) Minimizing dams impacts on biodiversity by way of translocations: the case of freshwater mussels. *Impact Assessment and Project Appraisal*. <https://doi.org/10.1080/14615517.2020.1836710>
- Popov, I. (2015). Impact of deforestation on pearl mussel habitats in the Russian section of the Baltic Sea basin. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 50, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.10.003>
- Preston, S.J., Keys, A. & Roberts, D. (2007). Culturing freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*: A breakthrough in the conservation of an endangered species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17, 539-549. <https://doi.org/10.1002/aqc.799>
- Quercus ANCN. (2015). *ECOTONE (LIFE10 NAT/PT/000073)*. Disponível em: <https://ecotonequercus.wordpress.com>
- Reid, A.J., Carlson, A.K., Creed, I.F., Eliason, E.J., Gell, P.A., Johnson, P.T.J. et al. (2018). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Reis, J. (2003). The freshwater pearl mussel [*Margaritifera margaritifera* (L.)] (Bivalvia, Unionoida) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation*, 114, 447-452. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00086-7)
- Reis, J. (2006). *Atlas dos bivalves de água doce em Portugal continental*. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
- San Miguel, E., Monserrat, S., Fernández, C., Amaro, R., Hermida, M., Ondina, P. et al. (2004). Growth models and longevity of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 1370-1379. <https://doi.org/10.1139/z04-113>
- Santos, R.M.B., Fernandes, L.S., Varandas, S.GP., Pereira, M. G., Sousa, R., Teixeira, A. et al. (2015). Impacts of climate change and land-use scenarios on *Margaritifera margaritifera*, an environmental indicator and endangered species. *Science of the Total Environment*, 511, 477-488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.090>
- Schartum, E., Mortensen, S., Pittman, K. & Jakobsen, P.J. (2017). From pedal to filter feeding: ctenidial organogenesis and implications for feeding in the postlarval freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies*, 83(1), 36-42. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyw037>
- Scheder, C., Lerchegger, B., Flödl, P., Csar, D., Gumpinger, C. and Hauer, C. (2015). River bed stability versus clogged interstitial: Depth-dependent accumulation of substances in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) habitats in Austrian streams as a function of hydromorphological parameters. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 50, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.08.003>

- Scheder, C., Lerchegger, B., Jung, M., Csar, D. & Gumpinger, C. (2014). Practical experience in the rearing of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*): advantages of a work-saving infection approach, survival, and growth of early life stages. *Hydrobiologia*, 735, 203–211. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1516-7>
- Schlesinger, W.H. (1991). *Biogeochemistry: an Analysis of Global Change*. San Diego, CA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-01654-7>
- Schmidt, C. & Vandr , R. (2010). Ten years of experience in the rearing of young freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20, 735-747. <https://doi.org/10.1002/aqc.1150>
- Scriven, K., Jones, H., Taylor, J., Aldridge, D. & Mcivor, A. (2011). A novel system for rearing freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae), at Mawddach Fish Hatchery in Wales, UK. In: F. Thielen (Eds.) *Ferrantia*, 64. Luxembourg: Musée national d'histoire naturelle, pp. 23-29.
- Skinner, A., Young, M. & Hastie, L. (2003). *Ecology of the Freshwater Pearl Mussel*. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No. 2 English Nature, Peterborough.
- Sousa, R., Amorim,  ., Froufe, E., Varandas, S., Teixeira, A. & Lopes-Lima, M. (2015). Conservation status of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Portugal. *Limnologica*, 50, 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.07.004>
- Strayer, D.L. & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 344-358. <https://doi.org/10.1899/08-171.1>
- Taeubert, J.E., Gum, B. & Geist, J. (2013). Variable development and excystment of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) at constant temperature. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 43, 319-322. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.01.002>
- Thomas, G.R., Taylor, J. & Garcia de Leaniz, C. (2010). Captive breeding of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Endangered Species Research*, 12, 1-9. <https://doi.org/10.3354/esr00286>
- Varandas, S., Lopes-Lima, M., Teixeira, A., Hinzmann, M., Reis, J., Cortes, R. et al. (2013). Ecology of southern European pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*): first record of two new populations on the rivers Terva and Be a (Portugal). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23, 374-389. <https://doi.org/10.1002/aqc.2321>
- Vaughn, C.C. (2018). Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia*, 810, 15-27. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3139-x>
- Vaughn, C.C. & Hakenkamp, C.C. (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 46, 1431-1446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x>
- Watters, G. (2000). Freshwater mussels and water quality: A review of the effects of hydrologic and instream habitat alterations. *Proceedings of the First Freshwater Mollusk Conservation Society Symposium*, 261-274.

Xunta de Galicia. (2015). *LIFE Margal Ulla (LIFE09 NAT/ES/000514)*. Disponível em: <https://margalulla.xunta.es>

Young, M.R., Cosgrove, P.J. & Hastie, L.C. (2001). The extent of, and causes for, the decline of a highly threatened naiad: *Margaritifera margaritifera*. In: G. Bauer, K. Wächtler (Eds.) *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. Heidelberg, Berlin: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56869-5_19

Young, M. & Williams, J. (1984a). The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn.) in Scotland. I: Field studies. *Archiv fur Hydrobiologie*, 99, 405-422.

Young, M. & Williams, J. (1984b). The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn.) in Scotland. II: Laboratory studies. *Archiv fur Hydrobiologie*, 100, 29-43.

Zimmerman, L.L. (2003). *Propagation of juvenile freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) and assessment of habitat suitability for restoration of mussels in the Clinch River, Virginia*. MSc Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA.

7. ANEXOS

Tabela 7.1 – Granulometria da areia utilizada como substrato de crescimento dos juvenis de *M. margaritifera* criados em *raceway* interior.

| Granulometria (mm) | Proporção |
|--------------------|-----------|
| < 0,25 | 12,5% |
| [0,25-0,5[| 50% |
| [0,5-1[| 25% |
| ≥ 1 | 12,5% |

Tabela 7.2 – Calendarização dos momentos de medição dos juvenis de *M. margaritifera* criados em cativeiro, em sistema aberto e sistema fechado.

| | Semana | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 04/05-10/05 | 11/05-17/05 | 18/05-24/05 | 25/05-31/05 | 01/06-07/06 | 08/06-14/06 | 15/06-21/06 | 22/06-28/06 | 29/06-05/07 | 06/07-12/07 | 13/07-19/07 | 21/09-27/09 |
| Sistema aberto | | | | | | | x | x | x | x | x | x |
| Sistema fechado | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | |

Tabela 7.3 – Variáveis ambientais avaliadas em cada local de estudo no rio Beça e respetiva contagem do número de medições por local de amostragem.

| | pH | Temperatura da água (°C) | Saturação de oxigénio (%) | Cobertura vegetal (%) | Largura do rio (m) | Profundidade (cm) | Velocidade de corrente (m/s) | | | Dimensão do substrato (mm) | Potencial <i>redox</i> (mV) | |
|----------------|----|--------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------------------|-----|-------|----------------------------|-----------------------------|-----------|
| | | | | | | | Superfície | 60% | Fundo | | Coluna de água | Substrato |
| Local 1 | 1 | 1 | 1 | 6 | 6 | 67 | 12 | 67 | 12 | 67 | 12 | 12 |
| Local 2 | 1 | 1 | 1 | 6 | 6 | 58 | 10 | 58 | 10 | 58 | 12 | 12 |
| Local 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 6 | 56 | 9 | 56 | 9 | 56 | 12 | 12 |

Tabela 7.4 – Número de juvenis de *M. margaritifera* sobreviventes por recipiente de cada ensaio de sistema fechado e respetivo valor médio.

| Recipiente | Ni | Semana | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|------------|--------------|------------|-----------|------------|
| | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | |
| | | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| A1 | 13 | 9 | 69% | 6 | 46% | 6 | 46% | 6 | 46% | 6 | 46% | 6 | 46% | 6 | 46% | 5 | 38% | 5 | 38% | 5 | 38% |
| A2 | 74 | 50 | 68% | 43 | 58% | 42 | 57% | 31 | 42% | 29 | 39% | 24 | 32% | 23 | 31% | 18 | 24% | 14 | 19% | 13 | 18% |
| A3 | 139 | 118 | 85% | 108 | 78% | 93 | 67% | 82 | 59% | 70 | 50% | 54 | 39% | 42 | 30% | 29 | 21% | 26 | 19% | 25 | 18% |
| A4 | 39 | 39 | 100% | 36 | 92% | 36 | 92% | 31 | 79% | 25 | 64% | 19 | 49% | 16 | 41% | 14 | 36% | 14 | 36% | 13 | 33% |
| ENSAIO A | 66 | 54 | 80% | 48 | 69% | 44 | 66% | 38 | 57% | 33 | 50% | 26 | 42% | 22 | 37% | 17 | 30% | 15 | 28% | 14 | 27% |
| B1 | 8 | 8 | 100% | 7 | 88% | 6 | 75% | 6 | 75% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - |
| B2 | 172 | 128 | 74% | 117 | 68% | 101 | 59% | 85 | 49% | 63 | 37% | 40 | 23% | 24 | 14% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - |
| B3 | 384 | 321 | 84% | 289 | 75% | 233 | 61% | 182 | 47% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - |
| B4 | 114 | 106 | 93% | 98 | 86% | 95 | 83% | 91 | 80% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - |
| B5 | 3 | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | 2 | 67% | - | - |
| ENSAIO B | 136 | 113 | 84% | 103 | 77% | 87 | 69% | 73 | 64% | 13 | 21% | 8 | 18% | 5 | 15% | <1 | 13% | <1 | 13% | - | - |
| C1 | 1 | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - | - | - |
| C2 | 43 | 34 | 79% | 34 | 79% | 27 | 63% | 27 | 63% | 27 | 63% | 24 | 56% | 18 | 42% | 17 | 40% | - | - | - | - |
| C3 | 146 | 124 | 85% | 117 | 80% | 85 | 58% | 74 | 51% | 63 | 43% | 56 | 38% | 50 | 34% | 39 | 27% | - | - | - | - |
| C4 | 63 | 45 | 71% | 43 | 68% | 43 | 68% | 43 | 68% | 38 | 60% | 36 | 57% | 33 | 52% | 30 | 48% | - | - | - | - |
| C5 | 2 | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | 2 | 100% | - | - | - | - |
| ENSAIO C | 51 | 41 | 67% | 39 | 65% | 31 | 58% | 29 | 56% | 26 | 53% | 24 | 50% | 21 | 46% | 18 | 43% | - | - | - | - |
| D2 | 112 | 106 | 95% | 78 | 70% | 78 | 70% | 61 | 54% | 0 | 0% | 0 | 0% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D3 | 297 | 263 | 89% | 63 | 21% | 9 | 3% | 8 | 3% | 7 | 2% | 7 | 2% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D4 | 224 | 194 | 87% | 180 | 80% | 155 | 69% | 147 | 66% | 140 | 63% | 125 | 56% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D5 | 66 | 66 | 100% | 66 | 100% | 66 | 100% | 62 | 94% | 58 | 88% | 11 | 17% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ENSAIO D | 175 | 157 | 92% | 97 | 68% | 77 | 60% | 70 | 54% | 51 | 38% | 36 | 19% | - | - | - | - | - | - | - | - |

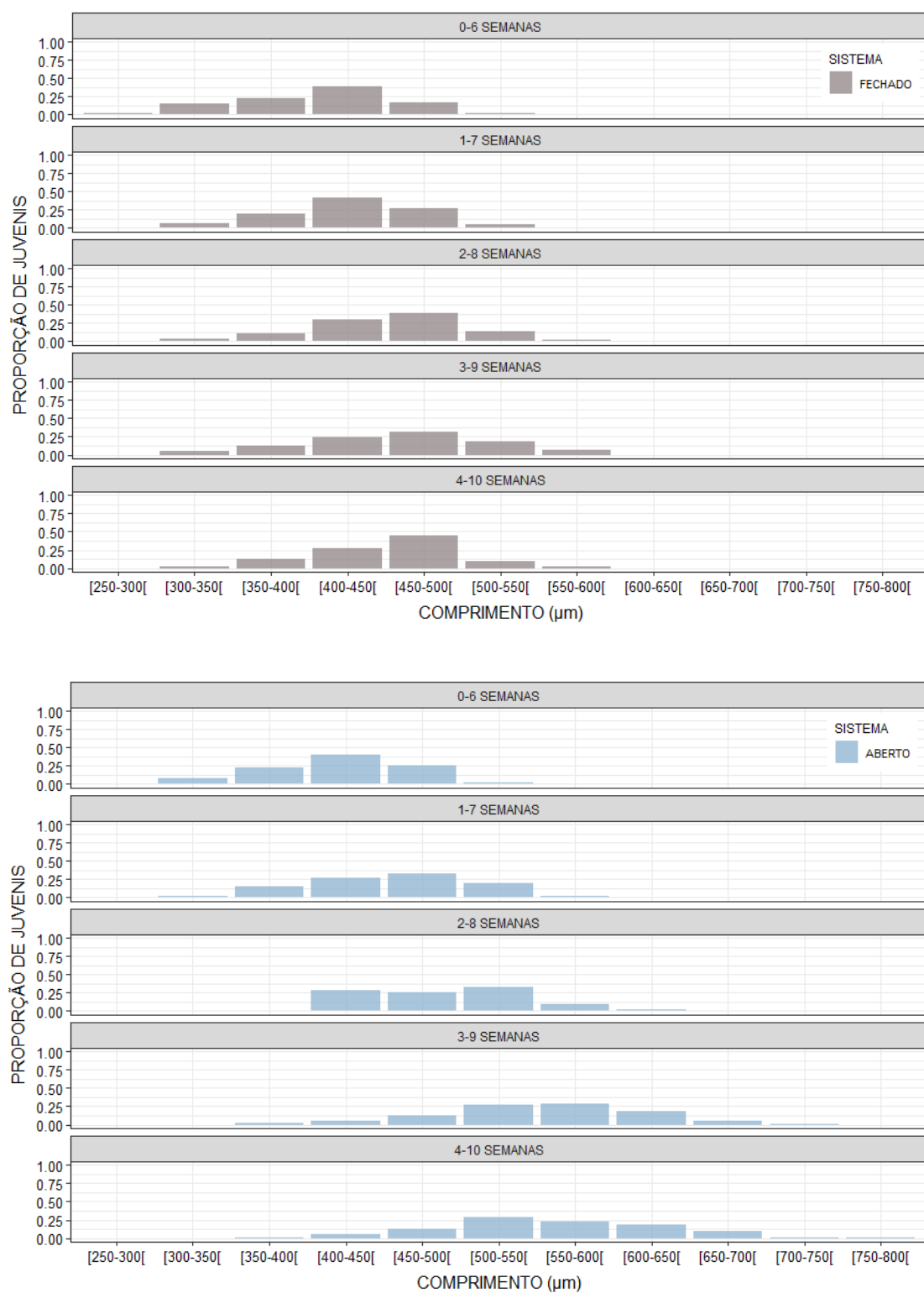


Figura 7.1 – Histogramas de distribuição de classes de comprimento máximo de concha, intervaladas de 50 μm , dos juvenis de *M. marginifera* criados em sistema fechado e sistema aberto.

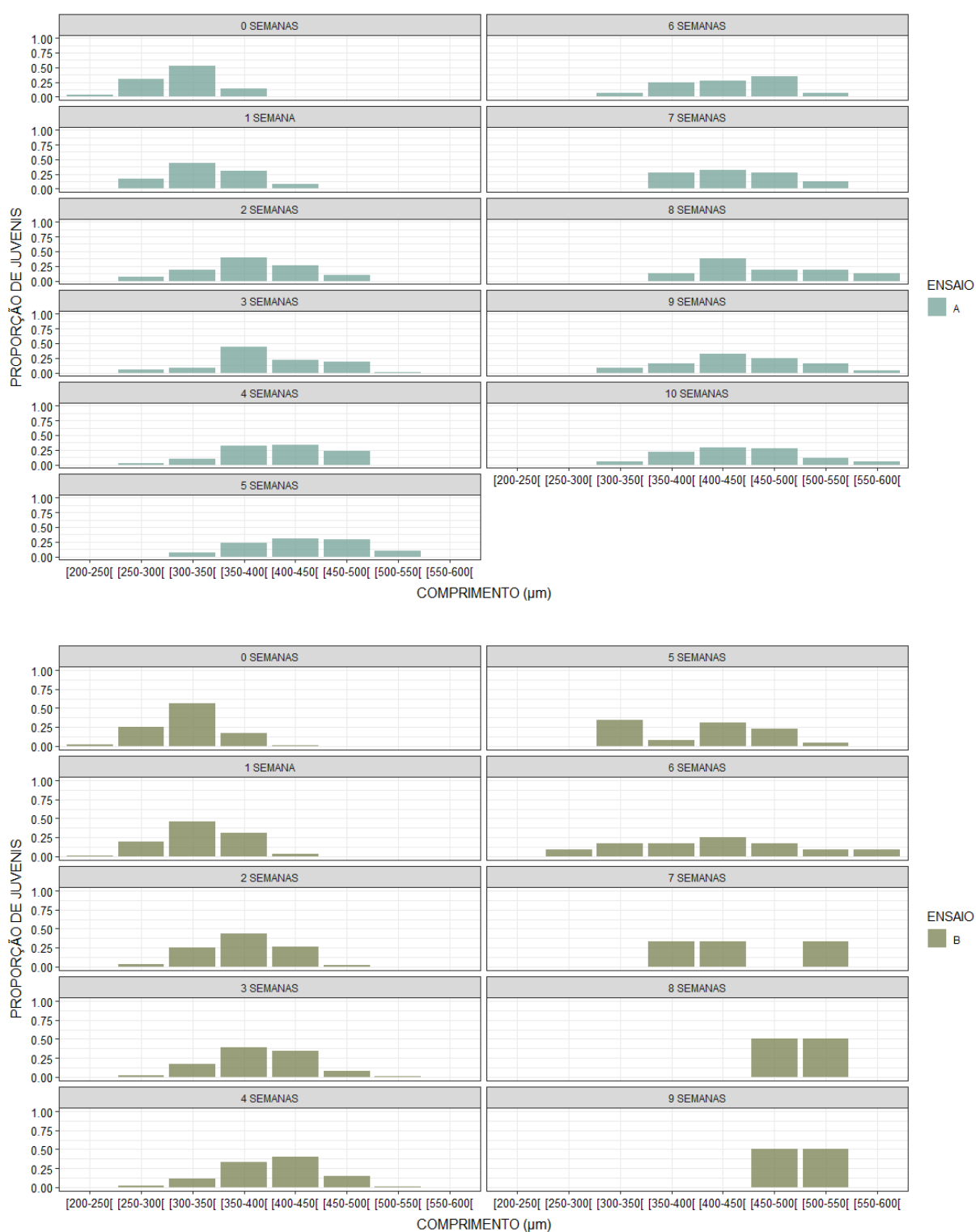


Figura 7.2 – Histogramas de distribuição de classes de comprimento máximo de concha, intervaladas de 50 µm, dos juvenis de *M. margaritifera* de cada ensaio de sistema fechado.

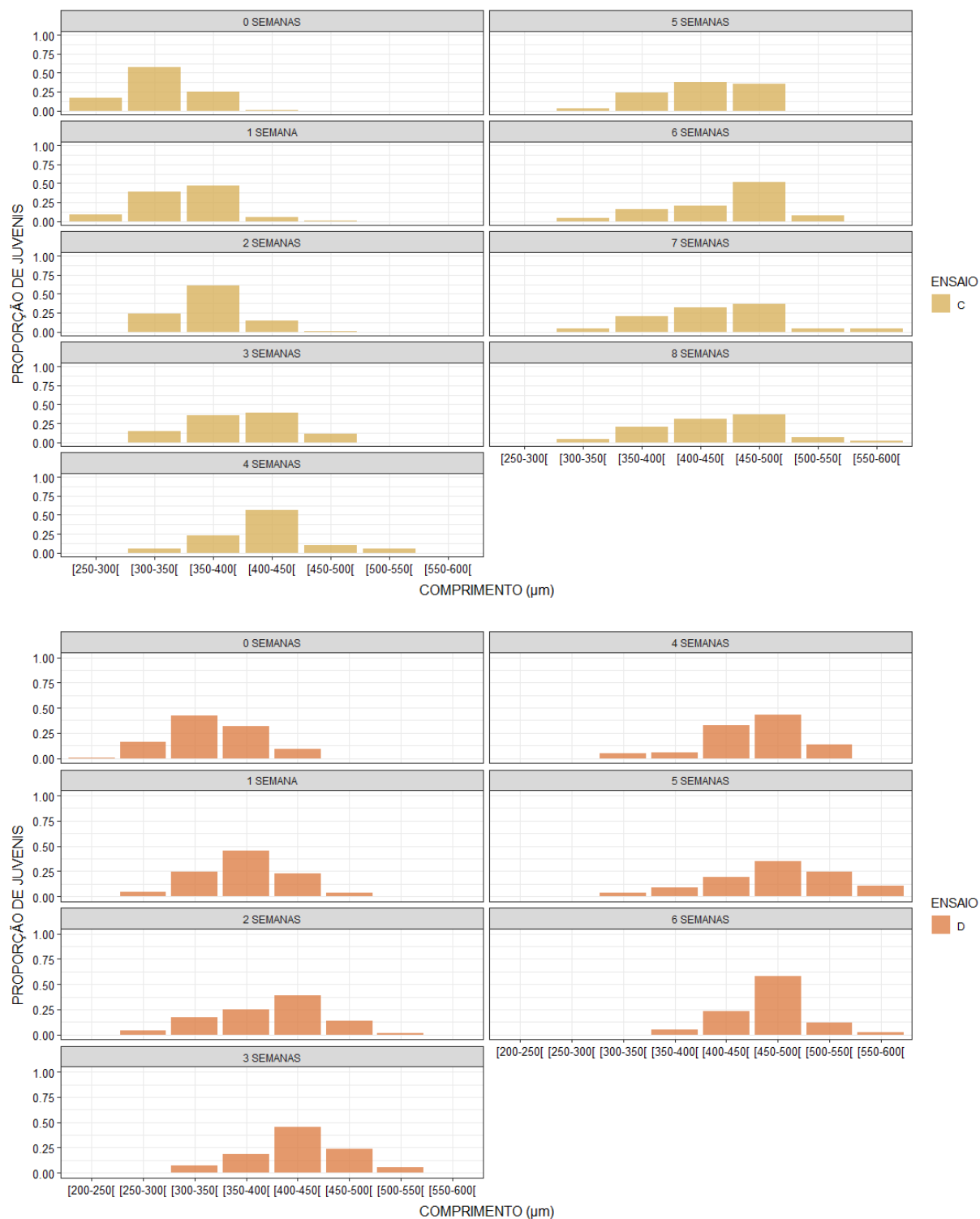


Figura 7.2 (cont.) – Histogramas de distribuição de classes do comprimento máximo de concha, intervaladas de 50 μm, dos juvenis de *M. margaritifera* de cada ensaio de sistema fechado.